

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Wei-Yu'Lo et al.  
Serial No. :  
Filed : Herewith  
Title : LAC SHUTTLE VECTORS

Art Unit : Unknown  
Examiner : Unknown

**BOX PATENT APPLICATION**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231



#5

**TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC § 119**

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC § 119 from Taiwan  
Application No. 89110235 filed May 26, 2000.

A certified copy of the application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: \_\_\_\_\_

2-7-01

*Y. Rocky Tsao*  
\_\_\_\_\_  
Y. Rocky Tsao  
Reg. No. 34,053

Fish & Richardson P.C.  
225 Franklin Street  
Boston, MA 02110-2804  
Telephone: (617) 542-5070  
Facsimile: (617) 542-8906

20197343.doc

**CERTIFICATE OF MAILING BY EXPRESS MAIL**

Express Mail Label No. EL624273946US

I hereby certify under 37 CFR §1.10 that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail Post Office to Addressee with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

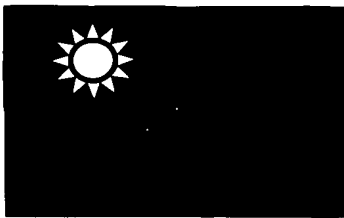
Date of Deposit

February 7, 2001

Signature

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate

*Samantha Bell*  
\_\_\_\_\_  
*Samantha Bell*  
\_\_\_\_\_  
Samantha Bell



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS  
REPUBLIC OF CHINA

J1036 U.S. PRO

09/778516



02/07/01

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，

其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2000 年 05 月 26 日  
Application Date

申請案號：089110235  
Application No.

申請人：華星生物科技股份有限公司  
Applicant(s)

局長

Director General

陳明邦

發文日期：西元 2000 年 12 月 29 日  
Issue Date

發文字號：08911018589  
Serial No.

申請日期：

案號：

類別：

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	乳酸菌穿梭載體
	英 文	
二、 發明人	姓 名 (中文)	1. 羅璋瑜 2. 羅敏菁 3. 廖珮如
	姓 名 (英文)	1. Wei-Yu Lo 2. Ming Ching Lo 3. Pei-Ru Liou
	國 籍	1. 中華民國 2. 中華民國 3. 中華民國
	住、居所	1. 台北市北投區東華路二段102巷1弄8號4樓 2. 台北縣汐止市樟樹一路187號13樓 3. 台北市石牌路二段318號2樓
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 華星生物科技股份有限公司
	姓 名 (名稱) (英文)	1. ANAWRAHTA BIOTECH CO., LTD.
	國 籍	1. 中華民國
	住、居所 (事務所)	1. 台北縣汐止市新台五路一段112號18樓
	代表人 姓 名 (中文)	1. 羅敏菁
	代表人 姓 名 (英文)	1.



四、中文發明摘要 (發明之名稱：乳酸菌穿梭載體)

本發明揭露一種乳酸菌穿梭載體，至少包括 (a) 一大腸桿菌質體複製起源區；(b) 一真核細胞基因表現卡匣，其至少包括一真核細胞基因轉錄啟動子、多重限制酶選殖區及一轉錄終止區；(c) 一乳酸菌質體序列，其至少包括一正股複製起源區及一與質體複製有關的蛋白質序列；以及 (d) 一非抗藥性篩選基因及其啟動子。本發明之乳酸菌穿梭載體以非抗藥性基因作為篩選標誌，因此特別適合用於食品及醫藥品之使用。

英文發明摘要 (發明之名稱：)



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

食品工業發展研究所

2000/05/16

CCRC 940294

食品工業發展研究所

2000/05/16

CCRC 940295

食品工業發展研究所

2000/05/16

CCRC 910147



## 五、發明說明 (1)

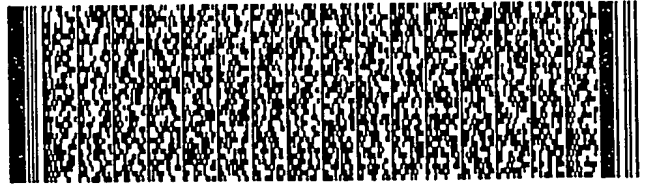
### 發明領域

本發明係有關於一種乳酸菌穿梭載體，特別是有關於可在真核細胞中表現外源性基因，並且具有非抗藥性篩選基因的乳酸菌穿梭載體之製備方法及用途。

### 發明背景

目前已發展的DNA疫苗大部分藉由鼠傷寒桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 或是產單核細胞李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 作為媒介以攝取至動物體內 (Dietrich G., et al, 1998, Nature Biotech., 16:181-185; Lowrie, D. B., 1998, Nature Med., 4:147-148)，其優點為可直接媒介DNA疫苗進入免疫細胞或是可刺激免疫系統，以加強免疫反應，其效果通常會比單獨使用DNA作為疫苗者更佳，但使用這兩類減毒菌種，仍不免可能因為菌種突變，反而造成危害生物體及致病之虞。

當進行基因工程操作時，質體上必須載有篩選標誌基因 (selection marker)，以供挑選含有此質體之菌株。一般市售質體多以抗藥性基因，例如抗胺苄青黴素基因 (Ampicillin resistance gene) 及抗卡那黴素基因 (Kanamycin resistance gene) 作為篩選標誌，由於這些質體多使用於實驗室中，因此較無安全性之考量。然而，若要將質體作為醫藥級之疫苗用質體或食品級之菌株改良用質體，則抗藥性基因在進入生物體之後，可能經由自然界的傳導作用，使得生物體內的其他菌種也含有這些



## 五、發明說明 (2)

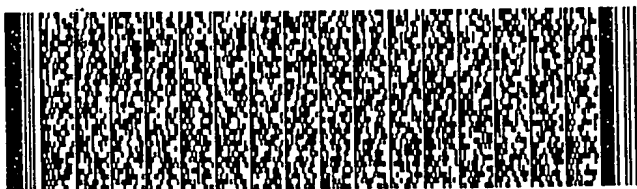
抗藥性基因，進而危害到使用此質體或其衍生物之生物體的健康。

因此，構築不含抗藥性基因之載體，且利用不會對生物體造成危害的媒介宿主，以在生物體內表現外源性基因或作為健康食品，或作為DNA疫苗，以提高其安全性及免疫效果，即為本發明之目的。

為改善傳統上DNA疫苗使用減毒之傷寒桿菌及李斯特菌作為媒介，可能產生致病性的危險，因此，本發明選用乳酸菌作為疫苗媒介，以提高DNA疫苗的免疫效果及安全性。乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) 是屬於非致病性之革蘭氏陽性菌種，在乳製品及食品工業中具有主要的經濟效益，同時乳酸菌亦為腸道內的正常菌叢 (normal flora) (Bomba A., et al, 1994, Vet. Med. (praha), 39:701-710; Nemcova R., et al, 1998, DTW Dtsch tierarztl wochenscher, 105:199-200)，且其菌體細胞壁上的一些化學組成份可刺激人體的免疫反應 (Vilma M. A., et al, 1996, Chem. Pharm. Bull., 44(12): 2263-2267)，若對乳酸菌進行菌種改良，使乳酸菌可攜帶DNA疫苗或外源性蛋白基因，將可增進生物體攝取後的免疫力或健康狀況，或是可藉由分子遺傳工具來進行基因重組，以獲得在食品工業中更具經濟價值之乳酸菌種。

### 發明摘述

有鑑於此，本發明的主要目的在於提供一種乳酸菌穿梭載體，其至少包括：(a) 一大腸桿菌質體複製起源



### 五、發明說明 (3)

區；(b)一真核細胞基因表現卡匣，其至少包括一真核細胞基因轉錄啟動子、多重限制酶選殖區及一轉錄終止區；(c)一乳酸菌質體序列，其至少包括一正股複製起源區及一與質體複製有關的蛋白質序列；以及(d)一非抗藥性篩選基因及其啟動子。

本發明的另一目的在於提供一種表現外源性基因的乳酸菌穿梭載體及試劑組，其係將含有外源性基因之前述乳酸菌穿梭載體，送入至適當的真核宿主細胞，而表現出外源蛋白質。

本發明之又一目的在於提供一種基因疫苗載體，其係將致病原或腫瘤之抗原基因嵌入前述之乳酸菌穿梭載體內。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵以及優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例並配合所附圖示，做詳細說明如下：

#### 圖示之簡單說明

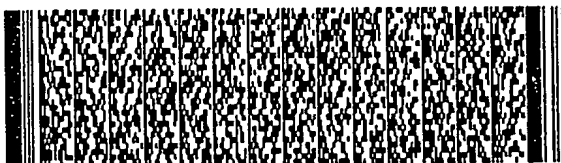
第1圖顯示pCLP1及pCLP2質體之構築；

第2圖顯示pCRII/EmrP- $\beta$ -galactosidase質體之構築；

第3圖顯示pCLP3、pCLP4、pCLP5及pCLP6質體之構築；

第4圖顯示pCLP7及pCLP8質體之構築；

第5(A)-(G)圖顯示乳酸菌穿梭載體基因pCLP7之核苷酸序列(序列辨識編號：1)；





#### 五、發明說明 (4)

第6(A)-(G)圖顯示乳酸菌穿梭載體基因pCLP8之核苷酸序列 (序列辨識編號: 2) ; 以及

第7圖顯示pCLP7及pCLP8質體之穩定性試驗結果, (A)是原始的質體, (B)是經100代繼代培養之後的限制酶圖譜; 其中, (A)圖中: 第1道為DNA標記 (Gene Ruler™ 1kb Ladder, MBI), 第2、6道為未切之質體, 第3、7道係以XbaI處理, 第4、8道係以EcoRI處理, 第5、9道係以HindIII處理, 第10道為DNA標記 (Gene Ruler™ 100bp Ladder, MBI); 其中第2-5道為質體pCLP7, 第6-9道為質體pCLP8; (B)圖中: 第1道為DNA標記 (Gene Ruler™ 100bp Ladder, MBI), 第2道為DNA標記 (Gene Ruler™ 1kb Ladder, MBI), 第3、7道為未切之質體, 第4、8道係以XbaI處理, 第5、9道係以EcoRI處理, 第6、10道係以HindIII處理; 其中第3-6道為質體pCLP7, 第7-10道為質體pCLP8。

#### 發明之詳細說明

在本發明中, 名詞"穿梭載體"係指在載體上同時存在有大腸桿菌及乳酸菌之質體複製起源區 (replication origin), 使此載體可於大腸桿菌及乳酸菌中複製並增殖, 以突破質體菌種種別的限制性。

如上所述, 為了可在大腸桿菌中複製, 並有利於後續基因工程之操作, 因此, 在本發明之乳酸菌穿梭載體中, 構築在大腸桿菌中複製所需的複製起源區Col E1。

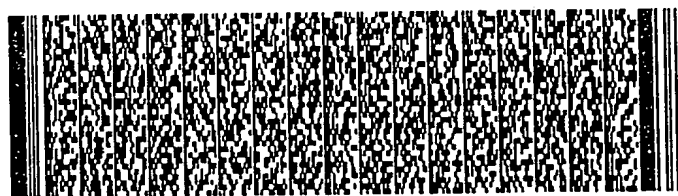
此外, 為了能在真核生物中表現外源性蛋白或作為



## 五、發明說明 (5)

DNA 疫苗載體，在本發明之乳酸菌穿梭載體中，構築一真核細胞基因表現卡匣，其至少包括一真核細胞基因轉錄啟動子、多重限制酶選殖區 (multiple cloning sites) 以及一轉錄終止區。上述這些元素的使用均無特定的限制，並且為熟悉此技藝之人士所能了解，舉例而言，可使用的真核細胞基因轉錄啟動子包括，例如，細胞巨大病毒啟動子 (CMV promoter)、SV40 啟動子 (Simian virus 40 early promotor) 及 RSV 啟動子 (Rous sarcoma virus) 等。在本發明之較佳具體實施例中，真核細胞基因轉錄啟動子是細胞巨大病毒啟動子 (此後簡稱 pCMV)，以及轉錄終止區是牛生長激素多腺苷酸 (BGH poly(A)) 區，其可以終止合成並穩定信使核糖核酸 (mRNA)。

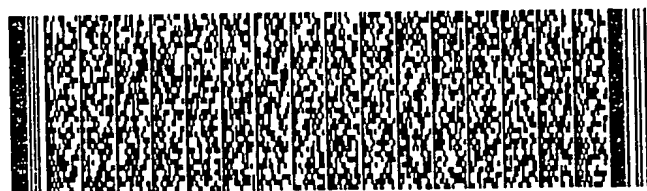
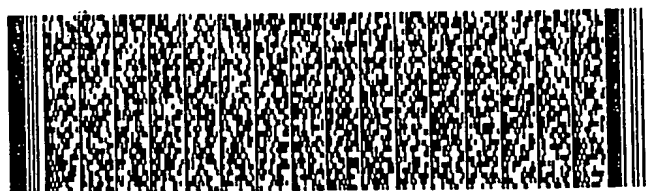
目前已知有許多乳酸菌株內含有天然生成的質體，而這些質體上所帶有的乳酸菌質體複製起始區及複製所必需的蛋白基因，即可應用於本發明之穿梭載體。胚芽乳酸菌 Lactobacillus plantarum (ATCC 8014; CCRC 10357) 菌種中已知含有三種大小的天然質體，分別是 2.1、10.5 及 38.8 仟鹼基 (kb) (Yan T-R., et al, 1996, Chinese Agri. Chem. Soc., 34:723-731)，由於基因操作技術的方便性及質體穩定性之要求，本發明選取這三個質體中最小的一個。此質體已知大小為 2.1 kb，含有質體正股複製起源區 (plus origin of replication)、一開放譯讀架構 (open reading frame) 以及一段 17 個核苷酸為一組，共重複 13 次的複製控制區域，其中，由此開放譯讀架構可



## 五、發明說明 (6)

轉譯出一個包含317個氨基酸的蛋白質，稱為Rep A蛋白質，其功能可能與此質體之複製有關 (Bouia A., et al, 1989, Plasmid, 22:185-192; Bringel F., et al, 1989, Plasmid, 22: 193-202)。本發明選取適當的限制酶 (例如，Bcl I)，在不會破壞上述兩個重要元素的前提下，將此質體切成線狀。以利接入本發明之穿梭載體中。

本發明選擇以乳酸菌株德爾布呂克氏乳酸菌 Lactobacillus delbrueckii (亞種 bulgaricus) (CCRC 14008) 之  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase) 基因作為篩選標誌基因，以取代抗藥性基因。 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的產物為代謝性酵素，其主要功能是將乳糖 (lactose) 分解為葡萄糖 (glucose) 及半乳糖 (galatose) (Schmidt B. F., et al, 1989, J. Bacteriol., 171:625-635)。因此，當菌株缺乏此酵素 (例如，大腸桿菌之JM109菌株)，而生長環境又以乳糖為唯一的碳源時，此菌株必須使用質體上之 $\beta$ -半乳糖苷酶基因產物代謝乳糖，以提供其生長所需之葡萄糖碳源 (Hashiba H., 1992, Biosci. Biotech. Biochem., 56: 190-194)。因此，本發明以 $\beta$ -半乳糖苷酶基因作為篩選標誌基因，不但可取代抗藥性基因的篩選功能，同時也符合醫藥及食品之安全考量。構築於此質體上之 $\beta$ -半乳糖苷酶基因，亦需要一啟動子以將其表現，更佳地，此啟動子是表現力強之基因轉錄啟動子 (Hashiba H., 1992,



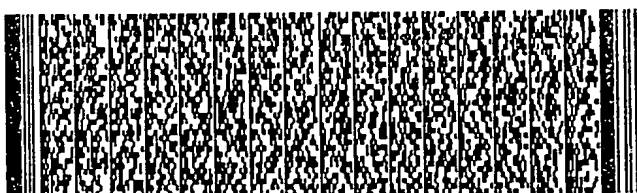
## 五、發明說明 (7)

Biosci. Biotech. Biochem., 56:190-194)，以大量生產基因產物。在本發明之較佳具體實施例中，此啟動子是抗紅黴素基因啟動子 (erythromycin resistance gene promoter；此後簡稱EmrP)。

根據本發明之設計，要利用上述之 $\beta$ -半乳糖苷酶基因作為篩選標誌基因，並使菌株對其產生依賴性，則須先破壞宿主菌株本身之 $\beta$ -半乳糖苷酶基因之功能（亦即，無法產生正常酵素功能的 $\beta$ -半乳糖苷酶）。本發明利用N-甲基-N'-硝基-N-亞硝胍

(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine；MNNG)，對處於生長旺盛期之宿主菌株進行處理；MNNG是一種烷化劑 (alkylating agent)，其容易作用於鳥糞嘌呤 (guanine) 及胸腺嘧啶 (thymine) 而造成DNA突變，以進一步篩選出 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的菌株。

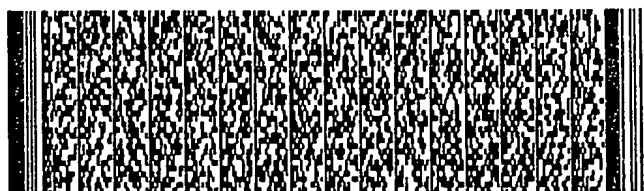
適合於本發明之乳酸菌穿梭載體的宿主菌株並無特定菌種的限制。本發明選擇乾酪乳酸菌 Lactobacillus casei (亞種 casei) 作為載體之宿主，其優點有三：(1) 此菌種為乳酪 (cheese) 生產菌種之一，符合食品安全性之要求；(2) 此菌種可在腸道中附著及群落化 (colonization)；以及 (3) 本發明之穿梭載體中所包含的乳酸菌質體複製起源區，已知可在此宿主菌株中穩定地複製及分離 (segregation) (Leer R., et al, 1992, Mol. Gen. Genet., 234:265-274；Posno M., et al, 1991, Appl. Environmental Microbiol. 57:1822-1828



#### 五、發明說明 (8)

)。應了解的是，乳酸菌屬於革蘭氏陽性細菌，而本發明之穿梭載體同時帶有大腸桿菌及乳酸菌之複製起源區，因此，在遺傳上性質相似的革蘭氏陽性細菌均可作為本發明之宿主，此為熟悉於此技藝者所已知。因此，將一適當的宿主菌株進行突變，以產生 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的菌株，即可使用於本發明之乳酸菌穿梭載體作為宿主菌株。在本發明之較佳具體實施例中，Lactobacillus casei (亞種casei) 以MNNG作用劑處理後，經5-溴-4-氯-3-吡啶基- $\beta$ -吡喃半乳糖 (X-gal) 及選擇性培養基的篩選後，得到一突變株 (Lac- mutant，命名為Ana-1)，寄存於中華民國食品工業發展研究所菌種中心，寄存號碼：CCRC 910147，申請日：中華民國89年5月16日。

在本發明之乳酸菌穿梭載體的多重限制酶選殖區中，插入適當的致病原或腫瘤之抗原基因，即可得一基因疫苗載體；將此基因疫苗載體轉形 (transform) 至 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的宿主菌株中，再以注射 (例如，靜脈、動脈、皮下、腹膜、顱內或肌肉注射) 或口服的方式進入生物體中，此時藉由生物體本身之胞飲或吞噬作用 (phagocytosis)，而可進入生物體的細胞中。由於本發明之乳酸菌穿梭載體上具有真核細胞基因轉錄啟動子，所以此時所攜帶的抗原基因即可表現並作用。本發明之乳酸菌穿梭載體配合 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的乳酸菌宿主，在作為基因疫苗上，具有以下的優點：(1) 乳酸菌無毒，也不會有致病性的疑慮；(2) 乳酸菌菌體細胞壁上



## 五、發明說明 (9)

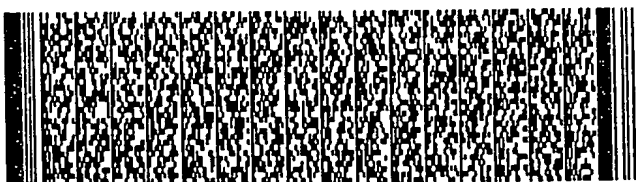
的化學組成份，可刺激並增強免疫反應；以及 (3) 以本發明之乳酸菌穿梭載體作為基因疫苗，其劑量遠低於直接注射DNA疫苗（前者約小於1毫克/劑量，而後者約需100毫克/劑量，且有注射部位的限制，例如，接近體表面的部位），同時也比使用病毒帶入較具安全性。

在本發明之乳酸菌穿梭載體的多重限制酶選殖區中，插入適當的外源性基因，則亦可利用本發明之乳酸菌穿梭載體上具有真核細胞基因轉錄啟動子，而在活體內或活體外的真核細胞中，大量表現有興趣的外源性蛋白。如同在此技藝中所熟知的技術，任何熟知此技藝之人士，均可將本發明之穿梭載體上的真核細胞基因轉錄啟動子，以一適當之原核細胞基因轉錄啟動子取代，以便在適當的原核細胞中，大量表現有興趣的外源性蛋白。

如上所述，將本發明之乳酸菌穿梭載體轉形至  $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的宿主菌株，可使用任何已知的方法而達成，例如，藉由化學或物理的方法，如磷酸鈣、二甲基亞砷 (DMSO)、雙價陽離子等，或是以電衝法 (Electroporation) 之高電壓，增加菌體細胞壁通透性，而把質體引入細菌體內。

### 實施例

本發明上述及之後在實施例中所使用的菌株，包括：Lactobacillus delbrueckii (亞種 bulgaricus) (CCRC 14008)、Lactobacillus plantarum (CCRC 10357) 以及 Lactobacillus casei (亞種 casei) (CCRC 10697)，均



## 五、發明說明 (10)

購自中華民國食品工業發展研究所菌種中心（台灣，新竹）。三種菌株均以37℃培養在乳酸菌MRS培養液中（蛋白胨第3號，10克/公升；牛肉萃取物，10克/公升；酵母萃取物，5克/公升；葡萄糖，20克/公升；Tween 80，1克/公升；檸檬酸銨，2克/公升；醋酸鈉，5克/公升； $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.1克/公升； $MnSO_4 \cdot H_2O$ ，0.05克/公升； $K_2HPO_4$ ，2克/公升；pH 6.2-6.5）。

實施例1： $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損突變株（Ana-1）之製備

將20微升（ $\mu L$ ）隔夜培養的Lactobacillus casei（亞種casei），接種至1毫升之MRS培養液，並在37℃培養4小時，然後離心沈澱並以磷酸鹽緩衝食鹽水（PBS；50 mM 磷酸鉀；150 mM 氯化鈉；pH 7.2）清洗2次。將細菌沈澱物再懸浮於0.9毫升的PBS中，並以0.1毫升的MNNG（N-甲基-N'-硝基-N-亞硝胍；5毫克/毫升溶於0.05 M 醋酸）處理。在37℃緩慢旋轉1小時之後，將細菌離心沈澱並以PBS清洗3次，然後再懸浮於0.1毫升的MRS培養液中。以MRS培養液進行10倍連續稀釋，在每個稀釋中取0.1毫升的菌液，各塗在含有40微升X-gal（20毫克/毫升）的100 mM MRS/洋菜培養基上。將這些培養基在37℃培養1-3天，挑選白色菌落作為Lactobacillus casei（亞種casei）的 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損突變株（Ana-1）。

實施例2：

1. Lactobacillus plantarum 質體之分離



## 五、發明說明 (11)

從15毫升MRS隔夜培養的培養液中收集Lactobacillus plantarum，將細菌以4.755毫升的溶液I（6.7%蔗糖；50 mM Tris-HCl，pH 7.6；1 mM EDTA，pH 8.0以及溶菌酶100微克/毫升），在37℃溶菌20分鐘。在加入482微升的溶液II（50 mM Tris-HCl，pH 7.6以及0.25 M EDTA）及276微升的溶液II（20%SDS；50 mM Tris-HCl，pH 7.6以及20 mM EDTA）之後，將混合物在37℃培養20分鐘，劇烈搖晃30秒，然後加入3 N NaOH 1.276毫升並旋轉10分鐘，最後再加入2 M Tris 496微升並旋轉10分鐘。為了萃取細菌蛋白質，將細菌溶胞物加入5 M NaCl 717微升及以3% NaCl飽和的酚700微升，離心後，水溶液相以等體積的氯仿-異戊醇（24：1）萃取。在混合及離心之後，水溶液相以等體積的異丙醇在0℃沈澱1小時，離心15分鐘，將DNA沈澱物風乾並以20微升的水溶解。質體DNA的質與量，以1%瓊脂糖電泳及溴化乙錠估計。

### 2. Lactobacillus plantarum 2.1 kb質體之選殖

由Lactobacillus plantarum分離的質體，以1%瓊脂糖凝膠電泳分開，並以GENRCLEAN III套組試劑（Bio 101, La Jolla, CA）純化。將2.1 kb的質體以BclI限制酶處理，並接進質體pCLP0的BglIII位置，以產生質體pCLP1及pCLP2。質體pCLP0包含有CMV啟動子、BGH poly(A)、Col E1複製起源區以及Amp<sup>R</sup>開放譯讀架構。上述質體的構造成份圖譜如第1圖所示。

實施例3：





## 五、發明說明 (12)

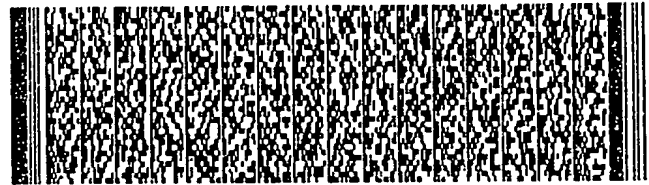
### 1. Lactobacillus delbrueckii (亞種bulgaricus) 染色體DNA的分離

從20毫升MRS隔夜培養的培養液中收集Lactobacillus delbrueckii (亞種bulgaricus)，將細菌沈澱物在37℃再懸浮於1毫升的TES緩衝液(100 mM Tris; 20 mM EDTA; 20%蔗糖以及1毫克/毫升的溶菌酶)30分鐘。然後將細胞以乾冰-酒精浴冷凍並在37℃的水浴解凍，以此方式進行5次的冷凍-解凍。細胞藉由加入1/2體積的1%SDS溶液而溶菌。染色體DNA藉由三次的酚萃取而純化。DNA最後以酒精沈澱，風乾並溶解在水中。

### 2. $\beta$ -半乳糖苷酶基因的選殖

$\beta$ -半乳糖苷酶基因藉由聚合酶鏈鎖反應(PCR)，而從Lactobacillus delbrueckii (亞種bulgaricus)的染色體DNA中放大。使用pfu Turbo™ DNA聚合酶(STRATAGENE®)；正向引子：

5'-aagctcatgaTTGGCAGCCAGTCTCCGGGGC-3'；及反向引子：5'-gacctcatgaACCGTCGCTAGCGACACGCC-3'。PCR反應條件為94℃、30秒，54℃、30秒以及72℃、3分鐘共反應30個循環。反應完成後以0.8%瓊脂糖凝膠電泳分析PCR產物，並以GENRCLEAN III套組試劑(Bio 101, La Jolla, CA)純化。將所純化的3 kb之 $\beta$ -半乳糖苷酶DNA片段接到pcDNA3載體(INVITROGEN)的EcoRV位置。將連接後的混合物轉形至大腸桿菌DH5  $\alpha$ 菌株。以X-gal/Amp LB洋菜膠培養基挑選帶有 $\beta$ -半乳糖苷酶基因質體的藍色選殖株。



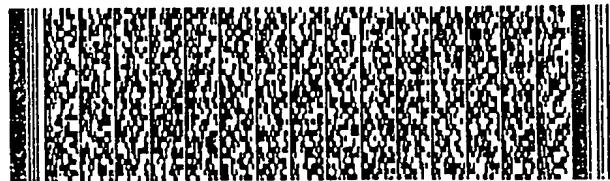
## 五、發明說明 (13)

實施例4：抗紅黴素基因啟動子 ( $Em^rP$ ) DNA 片段及抗紅黴素基因啟動子- $\beta$ -半乳糖苷酶DNA 片段的選殖

使用購自食品工業發展研究所菌種中心 (台灣, 新竹) 的質體pVA838作為模板, 藉由PCR以選殖 $Em^rP$  DNA 片段。所使用的正向引子為:

5'-TTAACGATCGTTAGAAGCAAACCTTAAGAGTG-3'; 反向引子為: 5'-TTAACGATCGATGTAATCACTCCTTCT-3'。PCR反應條件為94℃、30秒, 50℃、30秒以及72℃、30秒共反應30個循環。反應完成後以1%瓊脂糖凝膠電泳分析PCR產物, 並以酚/氯仿萃取及酒精沈澱而純化。將所純化的120 bp之 $Em^rP$  DNA 片段接到pCRII載體 (INVITROGENE)。將連接後的混合物轉形至大腸桿菌DH5  $\alpha$  菌株。以X-gal/Amp LB 洋菜膠培養基挑選帶有pCRII/ $Em^rP$  質體的白色選殖株, 並且以PCR及限制酶分析而進一步地確認。

pCRII/ $Em^rP$  質體以GFX Micro 質體製備套組試劑 (Amersham Pharmacia Biotech) 純化, 然後以BamHI使質體線形化, 並以T4 DNA 聚合酶補平末端。將 $\beta$ -半乳糖苷酶DNA 片段從pcDNA3/ $\beta$ -半乳糖苷酶質體中藉由PCR放大, 並接到線形化的pCRII/ $Em^rP$  質體之平端, 以構築pCRII/ $Em^rP$ - $\beta$ -半乳糖苷酶質體。以X-gal/Amp LB 洋菜膠培養基挑選帶有pCRII/ $Em^rP$ - $\beta$ -半乳糖苷酶質體的藍色選殖株, 並且以PCR及限制酶分析而進一步地確認。其質體構造成份圖譜如第2圖所示。



## 五、發明說明 (14)

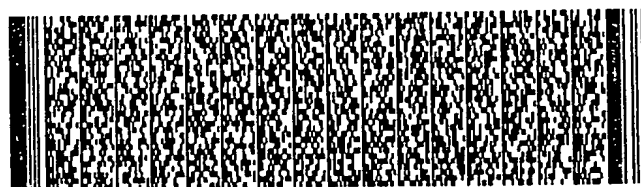
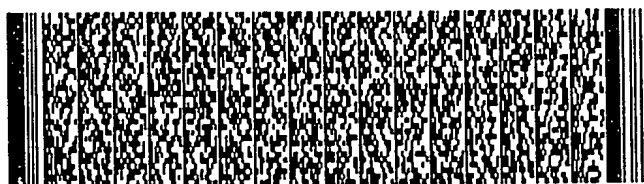
### 實施例5：乳酸菌穿梭載體之構築

Em<sup>r</sup>P- $\beta$ -半乳糖苷酶的DNA片段藉由PCR放大。在5'端磷酸化之後，DNA片段以GENRCLEAN III套組試劑 (Bio 101, La Jolla, CA) 純化，並接到質體pCLP1及pCLP2的NruI位置。將連接後的混合物以電衝法轉形至大腸桿菌JM109菌株。以X-gal/Amp LB洋菜膠培養基挑選帶有Em<sup>r</sup>P- $\beta$ -半乳糖苷酶質體的藍色選殖株，並且以PCR及限制酶分析而進一步地確認。其質體構造成份圖譜如第3圖所示。

將穿梭載體pCLP3及pCLP5以BspHI處理，以去除抗胺苳青黴素基因。此1 kb大小含有抗胺苳青黴素基因的DNA片段，藉由膠體洗脫 (gel-elution) 而丟棄。將所純化之DNA片段接合，並再轉形至大腸桿菌JM109菌株。這些帶有質體的選殖株，以L-M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，6克/公升；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，3克/公升；NaCl，5克/公升；NH<sub>4</sub>Cl，1克/公升；2 mM MgSO<sub>4</sub>；0.1%乳糖；0.1 mM CaCl<sub>2</sub>；2 mM 脯胺酸；50  $\mu$ M 硫胺素) 培養基而非Amp/LB培養基篩選，並且以PCR及限制酶分析而進一步地確認。其質體構造成份圖譜如第4圖所示。

### 實施例6：Ana-1勝任細胞之製備

為了製備用於電衝法之勝任細胞，將1毫升隔夜培養之 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的突變菌株Ana-1，接種至50毫升補充1.25%甘胺酸的MRS培養液中，並在37°C培養3小時。將細胞離心沈澱，以冰冷的電衝/儲存緩衝液 (0.5 M 蔗糖及10%甘油) 清洗4次，並再懸浮於0.5毫升冰冷的電



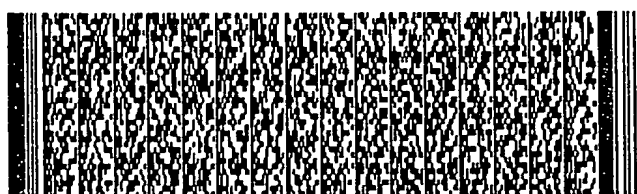
#### 五、發明說明 (15)

衝/儲存緩衝液中。質體DNA以QIAprep Miniprep套組試劑(QIAGEN)純化。將1微克的質體DNA與100微升的勝任細胞,在拋棄式小管(STRATAGENE®;電極間距0.2公分)中混合。以2500伏特的單一脈衝(600 ohm, 25  $\mu$ F)傳遞至此DNA-細胞的混合物。脈衝之後,將細胞懸浮液以0.4毫升的MRS培養液直接稀釋,並在37°C中培養1.5小時,以使得 $\beta$ -半乳糖苷酶基因表現。將100微升的細胞懸浮稀釋液塗在L-MRS(配方相同於MRS,除了葡萄糖以0.2%的乳糖取代之外)洋菜培養基上,以篩選轉形株(transformants)。

由上述本發明之較佳具體實施例的說明可知,由於BclI及BglII限制酶所切出之4個露出5'端的單股核酸序列相同,因此線狀的乳酸菌質體(LP),可以兩種不同的方向插入質體pCLP0中(參見第1圖);以PCR方法篩選可得到兩種不同的質體。本發明將Rep A基因與CMV啟動子方向相同的質體稱為pCLP1,而將方向相反的質體稱為pCLP2。

由於這兩種質體均可在大腸桿菌中複製多代,同時其限制酶圖譜亦不會改變,因此本發明將乳酸菌LP質體接到大腸桿菌的質體之後,不會影響此質體在大腸桿菌中的複製數及質體穩定性。

當帶有 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的質體進入染色體 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的菌株時,細菌為了能在選擇性培養基(含有乳糖但不含葡萄糖)中存活並複製,必須大量生產篩選標誌基因之產物,以代謝產生生長所需的元素(例

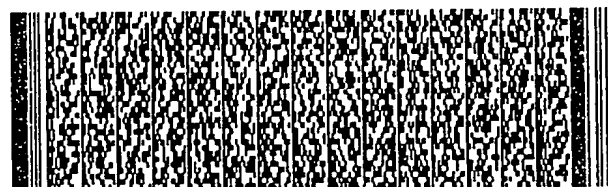


##### 五、發明說明 (16)

如，半乳糖苷酶），因此，本發明選擇表現力強的基因轉錄啟動子 $Em^rP$ 。在構築 $Em^rP-\beta$ -半乳糖苷酶基因之後，將其接入質體pCLP1及pCLP2中。由於均為平端接合（blunt end-ligation），因此， $Em^rP-\beta$ -半乳糖苷酶基因會以兩種不同的方向性接入。經過以PCR方法篩選，確實挑到4種不同的質體，分別命名為pCLP3、pCLP4、pCLP5及pCLP6（參見第3圖）。經過多次繼代培養之後，pCLP4及pCLP6的質體複製數及宿主菌體生長量明顯下降，因此推測pCLP4及pCLP6為結構上較不穩定的質體；反之，pCLP3及pCLP5則為結構上較穩定的質體。

接著，將pCLP3及pCLP5上的抗胺苄青黴素基因刪除，結果分別得到pCLP7及pCLP8（參見第4圖），當傳導進入大腸桿菌之後，菌株可生長於以乳糖為唯一碳源的培養基中；並且在經過繼代培養後，抽取其質體作限制酶圖譜分析，亦可確定其質體構造的穩定。因此，pCLP7及pCLP8這兩個穿梭載體，可適用於基因工程操作時的過程。pCLP7（序列辨識編號：1）的核酸序列如第5圖所示，其寄存號碼是CCRC 940294，申請日：中華民國89年5月16日；pCLP8（序列辨識編號：2）的核酸序列如第6圖所示，其寄存號碼是CCRC 940295，申請日：中華民國89年5月16日。pCLP7及pCLP8的限制酶圖譜請參見第7A圖。

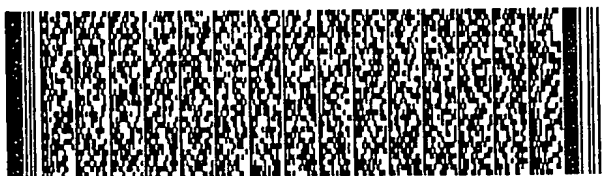
此外，將上述本發明之穿梭載體pCLP7及pCLP8轉形進入 $\beta$ -半乳糖苷酶基因缺損的菌株Ana-1時，此菌株仍可在選擇性的培養基中生長；並且在經過100代的繼代培養



##### 五、發明說明 (17)

後，抽取其質體作限制酶圖譜分析（參見第7B圖），亦可確定其質體構造的穩定性。

雖然本發明已以較佳具體實施例揭露如上，然其僅為舉例說明，而非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，所作之各種更動與潤飾均是在本發明之範疇之內，例如，對載體上各種元素位置之更動或以功能類似的元素取代、選擇其他宿主菌株等。因此，本發明之專利保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。



#### 六、申請專利範圍

1. 一種乳酸菌穿梭載體，其具有如序列辨識編號：1 (SEQ ID NO: 1) 之核酸序列。

2. 如申請專利範圍第1項所述之乳酸菌穿梭載體，其於中華民國食品工業發展研究所菌種中心之寄存號碼是 CCRC 940294，申請日：中華民國89年5月16日。

3. 一種乳酸菌穿梭載體，其具有如序列辨識編號：2 (SEQ ID NO: 2) 之核酸序列。

4. 如申請專利範圍第3項所述之乳酸菌穿梭載體，其於中華民國食品工業發展研究所菌種中心之寄存號碼是 CCRC 940295，申請日：中華民國89年5月16日。

5. 一種乳酸菌穿梭載體，其至少包括：

(a) 一大腸桿菌質體複製起源區；

(b) 一真核細胞基因表現卡匣，其至少包括一真核細胞基因轉錄啟動子、多重限制酶選殖區及一轉錄終止區；

(c) 一乳酸菌質體序列，其至少包括一正股複製起源區及一與質體複製有關的蛋白質序列；以及

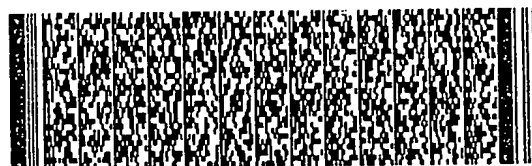
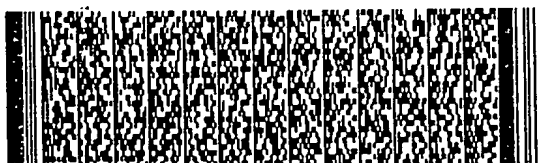
(d) 一非抗藥性篩選基因及其啟動子。

6. 如申請專利範圍第5項所述之乳酸菌穿梭載體，其中該真核細胞基因轉錄啟動子為細胞巨大病毒啟動子。

7. 如申請專利範圍第5項所述之乳酸菌穿梭載體，其中該乳酸菌質體序列，是分離自胚芽乳酸

菌 Lactobacillus plantarum 中之 2.1 kb 的質體。

8. 如申請專利範圍第7項所述之乳酸菌穿梭載體，其



## 六、申請專利範圍

中在該乳酸菌質體序列中，與質體複製有關的蛋白質是含有317個氨基酸的蛋白質Rep A。

9. 如申請專利範圍第5項所述之乳酸菌穿梭載體，其中該非抗藥性篩選基因是 $\beta$ -半乳糖苷酶基因。

10. 如申請專利範圍第9項所述之乳酸菌穿梭載體，其中該 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的啟動子是抗紅黴素基因啟動子。

11. 如申請專利範圍第1、3、5項中任一項所述之乳酸菌穿梭載體，其宿主為一革蘭氏陽性細菌，其中該細菌的基因組之 $\beta$ -半乳糖苷酶基因無法產生正常酵素功能。

12. 如申請專利範圍第11項所述之乳酸菌穿梭載體，其中該宿主為乾酪乳酸菌Lactobacillus casei（亞種casei）之突變株，其於中華民國食品工業發展研究所菌種中心之寄存號碼是CCRC 910147，申請日：中華民國89年5月16日。

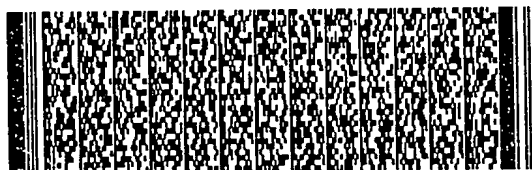
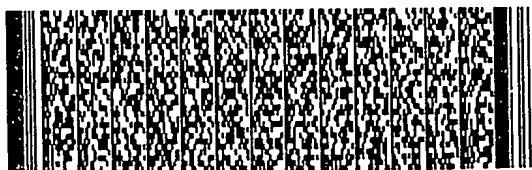
13. 一種表現外源性基因之試劑組，包括：

（1）如申請專利範圍第1、3、5項中任一項所述之乳酸菌穿梭載體；

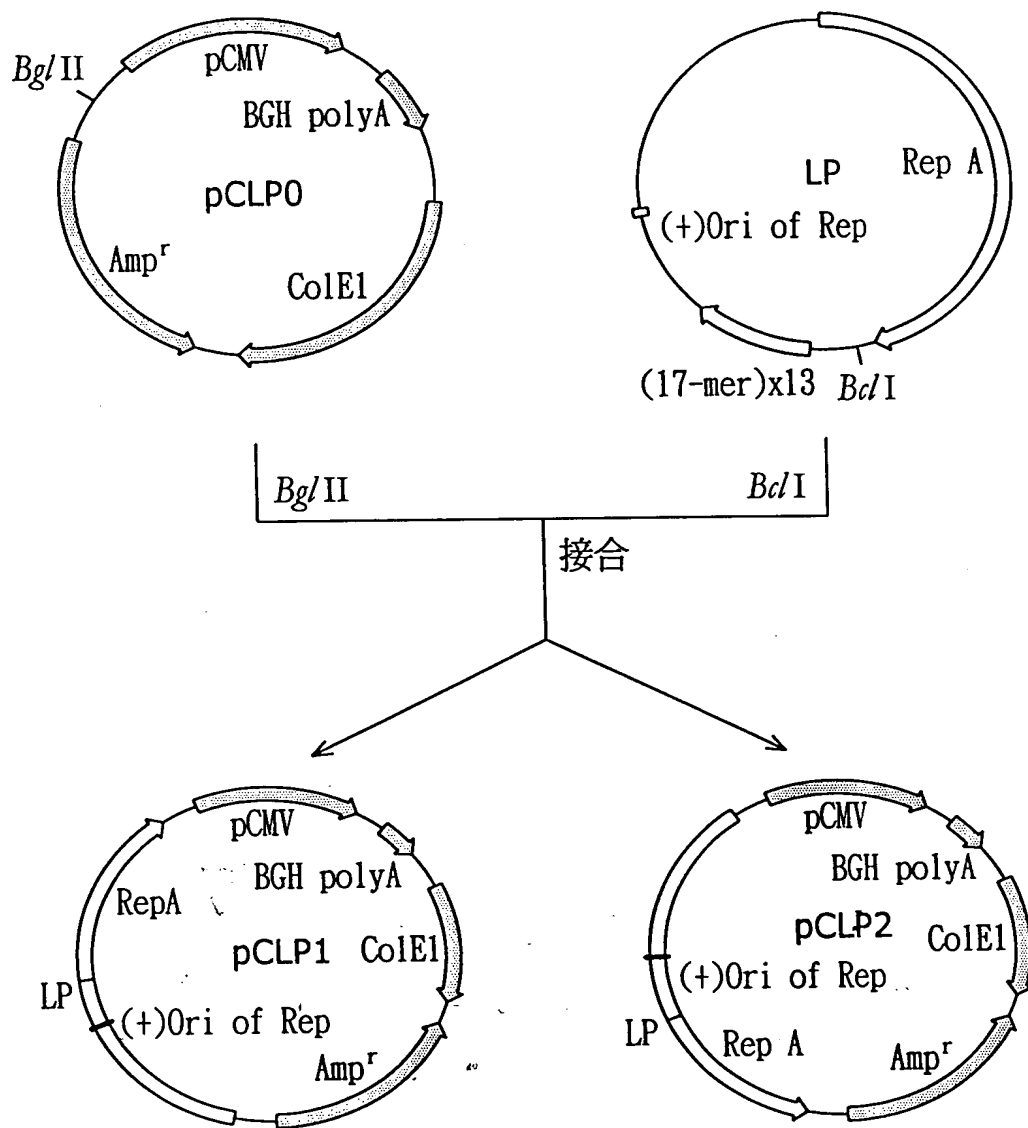
（2）一乳酸菌穿梭載體之宿主細胞，其中該細胞的基因組之 $\beta$ -半乳糖苷酶基因無法產生正常酵素功能；以及

（3）一真核細胞。

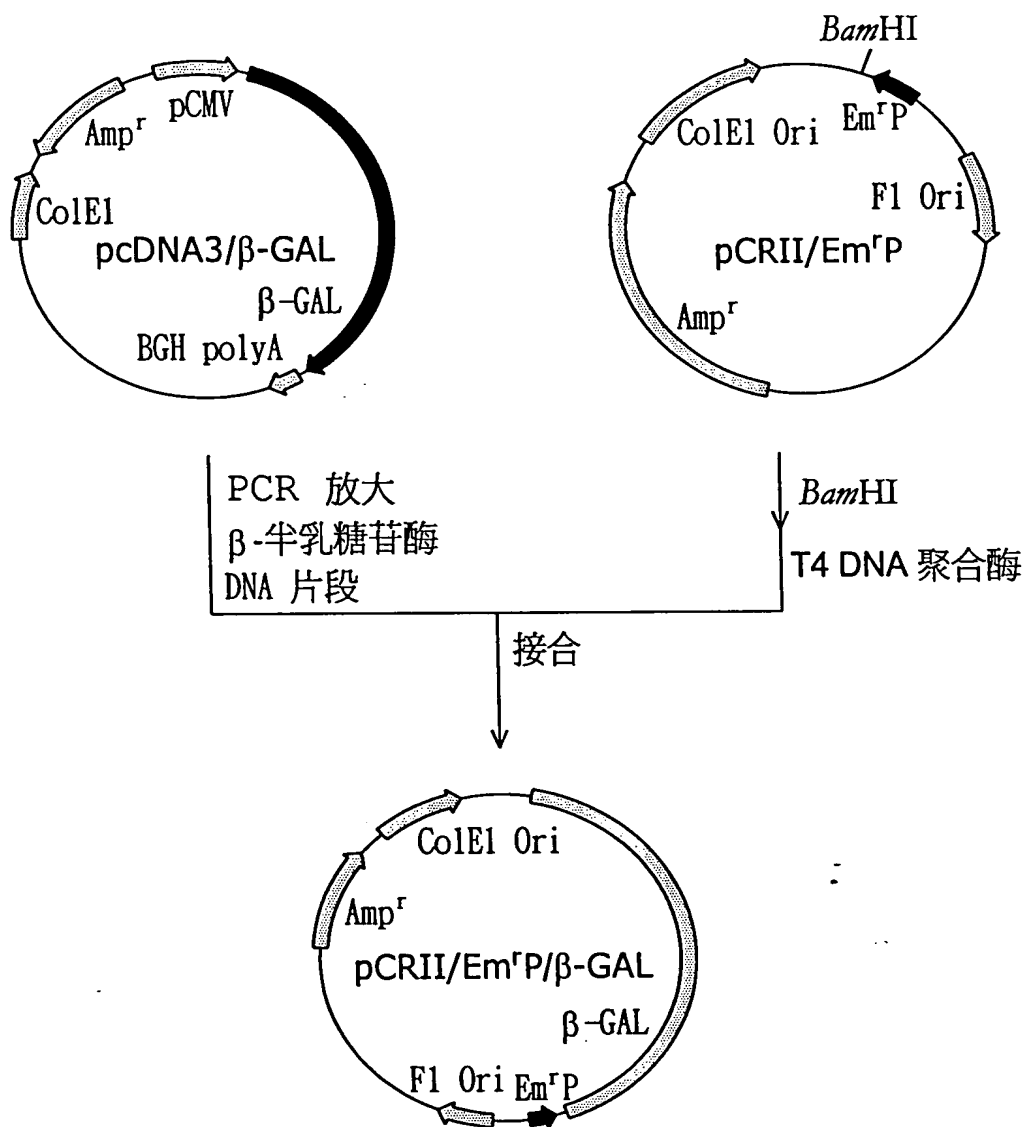
14. 一種DNA疫苗載體，其係指乳酸菌穿梭載體。



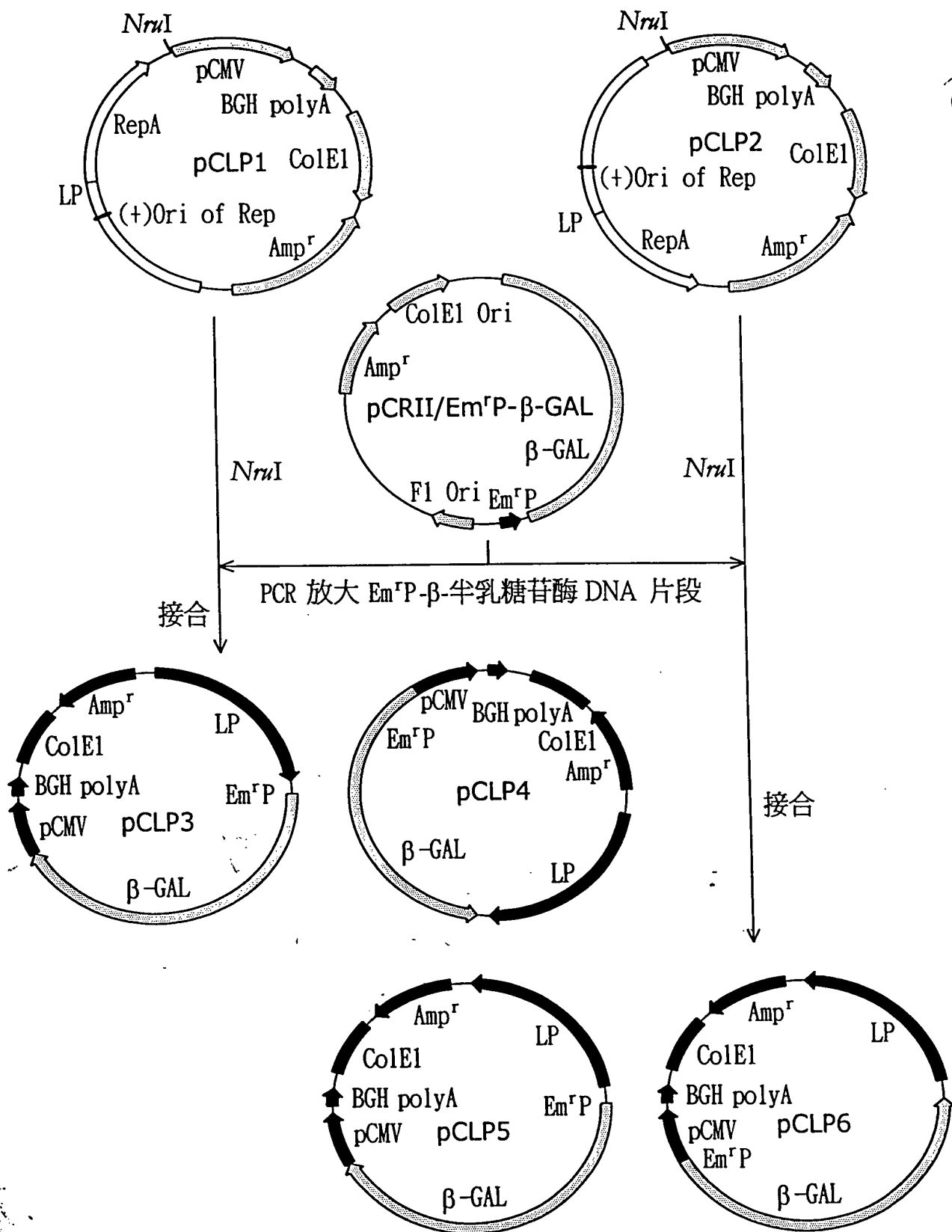




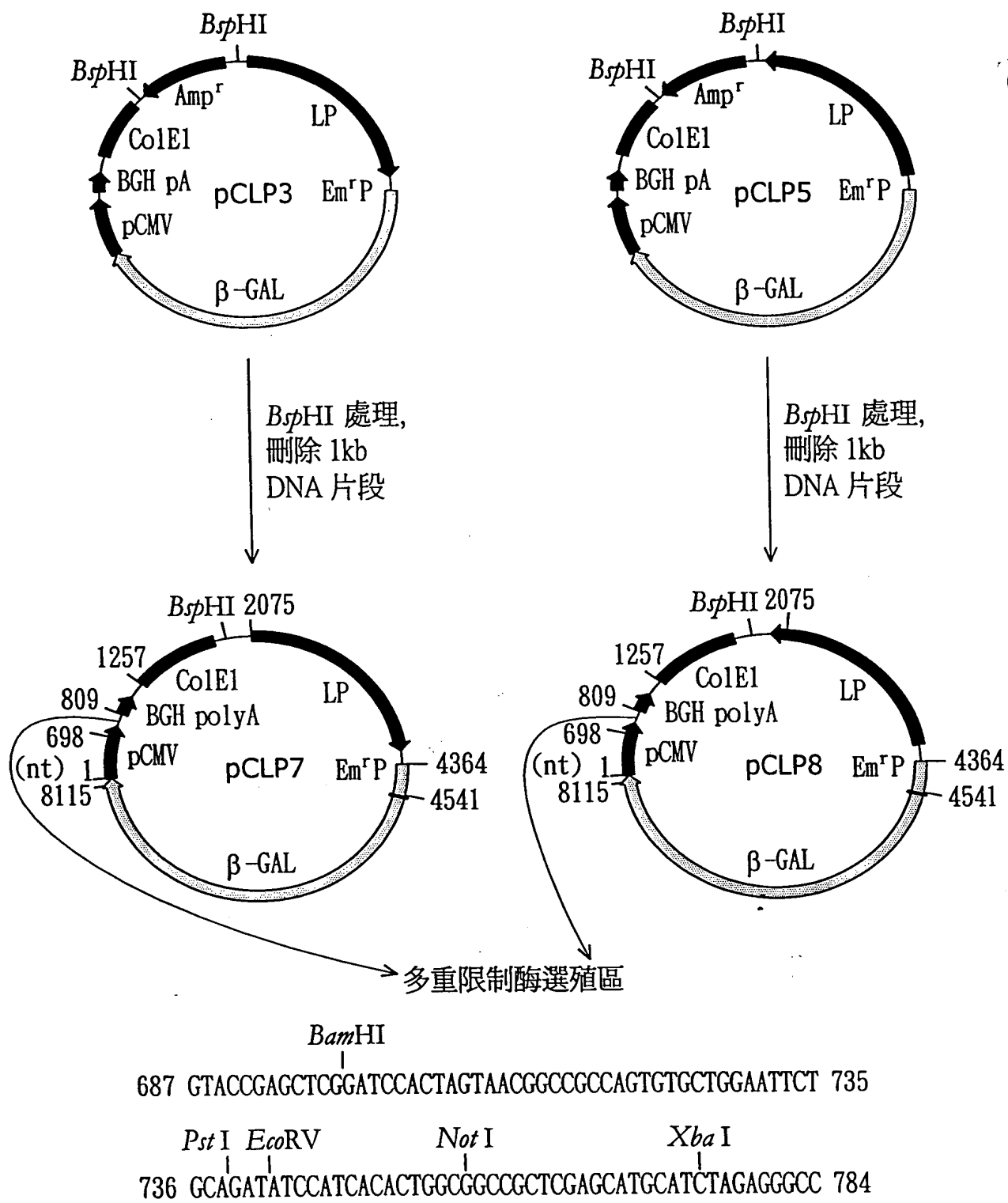
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖

10	20	30	40	50	60
GATGTACGGG	CCAGATATAC	GCGTTGACAT	TGATTATTGA	CTAGTTATTA	ATAGTAATCA
70	80	90	100	110	120
ATTACGGGGT	CATTAGTTCA	TAGCCCATAT	ATGGAGTTCC	GCGTTACATA	ACTTACGGTA
130	140	150	160	170	180
AATGGCCCGC	CTGGCTGACC	GCCCAACGAC	CCCCGCCCAT	TGACGTCAAT	AATGACGTAT
190	200	210	220	230	240
GTTCCCATAG	TAACGCCAAT	AGGGACTTTC	CATTGACGTC	AATGGGTGGA	CTATTTACGG
250	260	270	280	290	300
TAAACTGCCC	ACTTGGCAGT	ACATCAAGTG	TATCATATGC	CAAGTACGCC	CCCTATTGAC
310	320	330	340	350	360
GTCAATGACG	GTAAATGGCC	CGCCTGGCAT	TATGCCCAGT	ACATGACCTT	ATGGGACTTT
370	380	390	400	410	420
CCTACTTGGC	AGTACATCTA	CGTATTAGTC	ATCGCTATTA	CCATGGTGAT	GCGGTTTTGG
430	440	450	460	470	480
CAGTACATCA	ATGGGCGTGG	ATAGCGGTTT	GACTCACGGG	GATTTCCAAG	TCTCCACCCC
490	500	510	520	530	540
ATTGACGTCA	ATGGGAGTTT	GTTTTGGCAC	CAAAATCAAC	GGGACTTTCC	AAAATGTCTG
550	560	570	580	590	600
AACAACCTCG	CCCCATTGAC	GCAAATGGGC	GGTAGGCGTG	TACGGTGGA	GGTCTATATA
610	620	630	640	650	660
AGCAGAGCTC	TCTGGCTAAC	TAGAGAACCC	ACTGCTTACT	GGCTTATCGA	AATTAATACG
670	680	690	700	710	720
ACTCACTATA	GGGAGACCCA	AGCTTGGTAC	CGAGCTCGGA	TCCACTAGTA	ACGGCCGCCA
730	740	750	760	770	780
GTGTGCTGGA	ATTCTGCAGA	TATCCATCAC	ACTGGCGGCC	GCTCGAGCAT	GCATCTAGAG
790	800	810	820	830	840
GGCCCTATTTC	TATAGTGTC	CCTAAATGCT	AGAGCTCGCT	GATCAGCCTC	GACTGTGCCT
850	860	870	880	890	900
TCTAGTTGCC	AGCCATCTGT	TGTTTGCCCC	TCCCCCGTGC	CTTCCTTGAC	CCTGGAAGGT
910	920	930	940	950	960
GCCACTCCCA	CTGTCCTTTC	CTAATAAAAT	GAGGAAATTG	CATCGCATTG	TCTGAGTAGG
970	980	990	1000	1010	1020
TGTCATTCTA	TTCTGGGGGG	TGGGGTGGGG	CAGGACAGCA	AGGGGGAGGA	TTGGGAAGAC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AATAGCAGGC	ATGCTGGGGA	TGCGGTGGGC	TCTATGGCTT	CTGAGGCGGA	AAGAACCAGC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TGCATTAATG	AATCGGCCAA	CGCGCGGGGA	GAGGCGGTTT	GCGTATTGGG	CGCTCTTCCG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CTTCCTCGCT	CACTGACTCG	CTGCGCTCGG	TGTTTCGGCT	GCGGCGAGCG	GTATCAGCTC

第5A圖

第5B圖

第5C圖

第5D圖

第5E圖

第5F圖

第5G圖

## 第5A圖

1210	1220	1230	1240	1250	1260
ACTCAAAGGC	GGTAATACGG	TTATCCACAG	AATCAGGGGA	TAACGCAGGA	AAGAACATGT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GAGCAAAAGG	CCAGCAAAAG	GCCAGGAACC	GTAAAAAGGC	CGCGTTGCTG	GCGTTTTTCC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ATAGGCTCCG	CCCCCCTGAC	GAGCATCACA	AAAATCGACG	CTCAAGTCAG	AGGTGGCGAA
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ACCCGACAGG	ACTATAAAGA	TACCAGGCGT	TTCCCCCTGG	AAGCTCCCTC	GTGCGCTCTC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CTGTTCCGAC	CCTGCCGCTT	ACCGGATACC	TGTCCGCCCTT	TCTCCCTTCG	GGAAGCGTGG
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CGCTTTCTCA	ATGCTCACGC	TGTAGGTATC	TCAGTTCGGT	GTAGGTCGTT	CGCTCCAAGC
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TGGGCTGTGT	GCACGAACCC	CCCGTTCAGC	CCGACCGCTG	CGCCTTATCC	GGTAACTATC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
GTCTTGAGTC	CAACCCGGTA	AGACACGACT	TATCGCCACT	GGCAGCAGCC	ACTGGTAACA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GGATTAGCAG	AGCGAGGTAT	GTAGGCGGTG	CTACAGAGTT	CTTGAAGTGG	TGGCCTAACT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACGGCTACAC	TAGAAGGACA	GTATTGCGTA	TCTGCGCTCT	GCTGAAGCCA	GTTACCTTCG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GAAAAAGAGT	TGGTAGCTCT	TGATCCGGCA	AACAAACCAC	CGCTGGTAGC	GGTGGTTTTT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TTGTTTGCAA	GCAGCAGATT	ACGCGCAGAA	AAAAAGGATC	TCAAGAAGAT	CCTTTGATCT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
TTTCTACGGG	GTCTGACGCT	CAGTGGAAACG	AAAATCAGC	TTAAGGGATT	TTGGTCATGA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAT	AGGGGTTCCT	CGCACATTTC
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CCCGAAAAGT	GCCACCTGAC	GTCGACGGAT	CGGGAGATCA	ACGGTAAATC	CGTTGGCATA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
TCCCTTTTTT	GTGTGCAGCT	TGCTGACTTC	TGATACAGGT	TTTAGCATT	CTCCAATTTA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
TTTGGAGTGT	AAGTGACAT	TATCATGTAG	TGCGCATTAT	CATGTAGTGC	GCATTATCAT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GTAGTGCGCA	TTATCATGTA	GTGCGCATT	TCATGTAGTG	CGCATTATCA	TGTAGTGCGC
2290	2300	2310	2320	2330	2340
ATTATCATGT	AGTGCGCACA	TTATCATGTA	CATTATCATG	TAGTGCGCAT	TATCATGTAG
2350	2360	2370	2380	2390	2400
TGCGCACATT	ATCATGTAGT	GCGCATTATC	ATGTAGTGCG	CATTATCATG	TAGTGCGCAC

## 第5B圖

2410	2420	2430	2440	2450	2460
TTACACACAA	CATGAAGTTG	TGTTGTGCTA	AACCCATCAA	AACCTGCATC	AGATTTTCGCG
2470	2480	2490	2500	2510	2520
TTGCTCAAAC	GTAAGTACTG	TGCGTCAGTT	TGGAACATTC	AAAAATAAAT	AAGTTCAGTC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
GCTAGCTCCT	TCGAACTTTT	TTATTTTTTGA	ACGTTAATTT	TAAAGGCTCT	TATTTGCGTT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CTAAGCGATT	TTAGCTAACA	GTTAGCTATC	TAAGTGTCTG	TCAACGGTAA	ATCGACTTAG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
AGGGGCTTAT	TGAGCCTTAC	AGGCGATATT	AGCCCCCTCT	GGAGGCTTTA	AGGAGTTGAT
2710	2720	2730	2740	2750	2760
AGACTAGACA	ATACCAAAAG	CCTGACGTCT	TGGAAAACAA	GCCCTTGTTT	TCCCGAGCCC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
AGCGGCGGCA	AGCGTTACGG	TCCAGCTGGT	TCAGCTGGTC	AGTGTGGCTG	AAAGCCACGG
2830	2840	2850	2860	2870	2880
TTTAAAAAAA	GCAGTTCAGC	GGTTTTTGCT	GATCTGCTTT	TTGGGGTTTA	AAAACGCAAT
2890	2900	2910	2920	2930	2940
TTTTGGCGTT	TTCTTCTTAT	CTTGATACTA	TTAGCAACAA	CTAGTTTTTT	AAAATCAAGC
2950	2960	2970	2980	2990	3000
TTGATTAGGC	TTAATTGGGC	TTGTATCCAT	TGATTTTATA	GGCTTTTGGT	GTATTATTAG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GGTTATAAAT	TGGTTGAAAG	AAAGACAAA	TAAAAACCCA	CGTGCAAATT	CCTAGTTTGG
3070	3080	3090	3100	3110	3120
CCGCTCGGAA	CACGTGAGTT	GATTATCATT	TGCGATTAT	AGCCTATTCT	AGGGGAAAAG
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CCCTATGATG	TCAAGGTTAT	AAGCTTATTG	AAAAAGATAG	TCAGCTCCTT	CACGTGGATA
3190	3200	3210	3220	3230	3240
AACTGGAGGA	GCTTTTATG	TCAGAAATTT	TTGAAGATAA	AACTGAAAAT	GGCAAAGTTA
3250	3260	3270	3280	3290	3300
GACCTTGGCG	AGAACGGAAG	ATTGAAAATG	TGCGCTATGC	CGAATATTTG	GCAATCTTAG
3310	3320	3330	3340	3350	3360
AATTTAAACG	GGCACATGAT	GTACGGGGTT	GTGGTGAAGT	TTTGCGTTTT	CGTAAGATTG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
GCGAGCACTT	AAAACTTTAT	CAAACGTGGT	TTTGTCTATA	ACGATTGTGT	CCATTGTGTA
3430	3440	3450	3460	3470	3480
ATTGGAGAAG	GAGCATGAAA	AACTCGAGCC	AGTTAAAACA	AATTATTGCG	GAAGCAGTTG
3490	3500	3510	3520	3530	3540
CAAGAGAGCC	TAAAGGACGG	TTTTTGTTTT	TAACTTTAAC	CGTTAAAAAC	GCTCATTCAG
3550	3560	3570	3580	3590	3600
CAGAGGAGTT	AAAAGTGTCT	TTAAGAGCTT	TGACTAAAGC	CTTTAATAAG	CTAACTCGCT

## 第5C圖

3610	3620	3630	3640	3650	3660
ATAAAAAAGT	GACTAAAAAT	TTATTGGGTT	ATTTACGTTC	AACGGAAATT	ACCGTTAATG
3670	3680	3690	3700	3710	3720
AACAAGACGG	GTCATATAAT	CAACACTTGC	ATGTGTTGCT	GTTTGTAATA	TCAAGTTATT
3730	3740	3750	3760	3770	3780
TTAAGAATTC	AAATAATTAT	TTAGCACAAG	CAGAATGGGC	AAAATTATGG	CAAAAAGCCT
3790	3800	3810	3820	3830	3840
TGAAAGTTGA	TTATGAGCCT	GTGGTGCATG	TGCAGGCTGT	TAAAGCTAAC	AAACGTAAAG
3850	3860	3870	3880	3890	3900
GAAGTGAATC	TTTGCAAGCT	AGTGCCGAAG	AAACGGCGAA	ATACGAGGTA	AAATCAGCTG
3910	3920	3930	3940	3950	3960
ATTATATGAC	GGCTGATGAT	GAGCGTAATT	TGGTGGTGAT	TAAAAATTTG	GAGTATGCCT
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TAGCTGGAAC	ACGACAAATC	AGCTATGGTG	GATTATTAAA	GCAAATTAAG	CAAGATTTGA
4030	4040	4050	4060	4070	4080
AACTTGAAGA	TGTTGAGAAT	GGTGATTTAG	TTCATGTTGG	CGATGAAGAT	TACACCAAAG
4090	4100	4110	4120	4130	4140
AGCAAATGGA	AGCTGCGGAA	GAAGTTGTCG	CAAATGGGA	TTTTAATAAA	CAAAATTATT
4150	4160	4170	4180	4190	4200
TTATTTGGTA	AAGAGAAATG	CAGGATATGA	TCTCCCGATC	CCCTATGGTC	GACTCTCAGT
4210	4220	4230	4240	4250	4260
ACAATCTGCT	CTGATGCCGC	ATAGTTAAGC	CAGTATCTGC	TCCCTGCTTG	TGTGTTGGAG
4270	4280	4290	4300	4310	4320
GTCGCTGAGT	AGTGCGCGAG	CAAAATTTAA	GCTACAACAA	GGCAAGGCTT	GACCGACAAT
4330	4340	4350	4360	4370	4380
TGCATGAAGA	ATCTGCTTAG	GGTTAGGCGT	TTTGCGCTGC	TTCGTTAGAA	GCAAATAAG
4390	4400	4410	4420	4430	4440
AGTGTTGTTGA	GTAGTGCAGT	ATCTTAAAAT	TTTGTATAAT	AGGAATTGAA	GTAAATTAG
4450	4460	4470	4480	4490	4500
ATGCTAAAAA	TTTGTAATTA	AGAAGGAGTG	ATTACATGAT	TGGCAGCCAG	TCTCCGGGCA
4510	4520	4530	4540	4550	4560
ATTAATGAAC	TTGGACATGG	TTGACGACCC	GGTCTTTGCA	AGCCGAATTC	GACCACACTG
4570	4580	4590	4600	4610	4620
GCGGCCGTTA	CTAGGGTATC	GATCCGATAA	AAAGTTAGGC	GACGGCTTTG	CCCTGGTGCC
4630	4640	4650	4660	4670	4680
AGCAGACGGT	AAGGTCTACG	CGCCATTTGC	CGGTACTGTC	CGCCAGCTGG	CCAAGACCCG
4690	4700	4710	4720	4730	4740
GCACTCGATC	GTCCTGGAAT	ATGAACATGG	GGTCTTGGTC	TTGATTCAAC	TTGGCCTGGG
4750	4760	4770	4780	4790	4800
CACGGTCAAA	TTAAACGGGA	CTGGCTTTGT	CAGCTATGTT	GAAGAGGGCA	GCCAGGTAGA

## 第5D圖



4810	4820	4830	4840	4850	4860
AGCCGGCCAG	CAGATCCTGG	AATTCTGGGA	CCCGGCGATC	AAGCAGGCCA	AGCTGGACGA
4870	4880	4890	4900	4910	4920
CACGGTAATC	GTGACCGTCA	TCAACAGCGA	AACTTTTACA	AATAGCCAGA	TGCTCTTGCC
4930	4940	4950	4960	4970	4980
GATCGGCCAC	AGCGTCCAAG	CCCTGGATGA	TGTATTCAAG	TTAGAAGGGA	AGAATTAGAA
4990	5000	5010	5020	5030	5040
AATGAGCAAT	AAGTTAGTAA	AAGAAAAAAG	AGTTGACCAG	GCAGACCTGG	CCTGGCTGAC
5050	5060	5070	5080	5090	5100
TGACCCGGAA	GTTTACGAAG	TCAATACAAT	TCCCCCGCAC	TCCGACCATG	AGTCCTTCCA
5110	5120	5130	5140	5150	5160
AAGCCAGGAA	GAAGTGGAGG	AGGGCAAGTC	CAGTTTATAGT	CAGTCCCTGG	ACGGGGACTG
5170	5180	5190	5200	5210	5220
GCTGATTGAC	TACGCTGAAA	ACGGCCAGGG	ACCACTCAAC	TTCTATGCAG	AAGACTTTGA
5230	5240	5250	5260	5270	5280
CGATAGCAAT	TTTAAGTCAG	TCAAAGTACC	CGGCAACCTG	GAAGTGCAAG	GCTTTGGCCA
5290	5300	5310	5320	5330	5340
GCCCCAGTAT	GTCAACGTCC	AATATCCATG	GGACGGCAGT	GAGGAGATTT	TCCCCCCCCA
5350	5360	5370	5380	5390	5400
AATTCCAAGC	AAAAATCCGC	TCGCTTCTTA	TGTCAGATAC	TTTGACCTGG	ATGAAGCTTT
5410	5420	5430	5440	5450	5460
CTGGGACAAG	GAAGTCAGCT	TGAAGTTTGA	CGGGGCGGCA	ACAGCCATCT	ATGTCTGGCT
5470	5480	5490	5500	5510	5520
GAACGGCCAC	TTCGTCGGCT	ACGGGGAAGA	CTCCTTTACC	CCAAGCGAGT	TTATGGTTAC
5530	5540	5550	5560	5570	5580
CAAGTTCCTC	AAGAAAGAAA	ATAACCGCCT	GGCAGTGGCT	CTCTACAAGT	ATTCTTCCGC
5590	5600	5610	5620	5630	5640
CTCCTGGCTG	GAAGACCAGG	ACTTCTGGCG	CATGTCTGGT	TTGTTTCAAT	CAGTGACTCT
5650	5660	5670	5680	5690	5700
TCAGGCCAAG	CCGCGTCTGC	ACTTGGAGGA	CCTTAAGCTT	ACGGCCAGCT	TGACCGATAA
5710	5720	5730	5740	5750	5760
CTACCAAAAA	GGAAAGCTGG	AAGTCGAAGC	CAATATTGCC	TACCGCTTGC	CAAATGCCAG
5770	5780	5790	5800	5810	5820
CTTTAAGCTG	GAAGTGCGGG	ATAGTGAAGG	TGACTTGGTT	GCTGAAAAGC	TGGGCCCCAAT
5830	5840	5850	5860	5870	5880
CAGAAGCGAG	CAGCTGGAAT	TCACTCTGGC	TGATTTGCCA	GTAGCTGCCT	GGAGCGCGGA
5890	5900	5910	5920	5930	5940
AAAGCCTAAC	CTTTACCAGG	TCCGCCTGTA	TTTATACCAG	GCAGGCAGCC	TCTTAGAGGT
5950	5960	5970	5980	5990	6000
TAGCCGGCAG	GAAGTGGGTT	TCCGCAACTT	TGAACTAAAA	GACGGGATTA	TGTACCTTAA

## 第5E圖

6010	6020	6030	6040	6050	6060
CGGCCAGCGG	ATCGTCTTCA	AGGGGGCCAA	CCGGCACGAA	TTTGACAGTA	AGTTGGGTCC
6070	6080	6090	6100	6110	6120
GGCTATCACG	GAAGAGGATA	TGATCTGGGA	CATCAAGACC	ATGAAGCGAA	GCAACATCAA
6130	6140	6150	6160	6170	6180
TGCTGTCCGC	TGCTCTCACT	ACCCGAACCA	GTCCCTCTTT	TACCGGCTCT	GTGACAAGTA
6190	6200	6210	6220	6230	6240
CGGCCTTTAC	GTCATTGATG	AAGCTAACCT	GGAAAGCCAC	GGCACCTGGG	AAAAAGTGGG
6250	6260	6270	6280	6290	6300
GGGGCACGAA	GATCCTAGCT	TCAATGTTCC	AGGCGATGAC	CAGCATTTGGC	TGGGAGCCAG
6310	6320	6330	6340	6350	6360
CTTATCCCGG	GTGAAGAACA	TGATGGCTCG	GGACAAGAAC	CATGCTTCAA	TCCTAATCTG
6370	6380	6390	6400	6410	6420
GTCTTTAGGC	AATGAGTCTT	ACGCCGGCAC	TGTCTTTGCC	CAAATGGCTG	ATTACGTCCG
6430	6440	6450	6460	6470	6480
GAAGGCTGAT	CCGACCCGGG	TTCAGCACTA	TGAAGGGGTG	ACCCACAACC	GGAAGTTTGA
6490	6500	6510	6520	6530	6540
CGACGCCACC	CAGATTGAAA	GCCGGATGTA	TGCTCCGGCC	AAGGTAATTG	AAGAATACTT
6550	6560	6570	6580	6590	6600
GACCAATAAA	CCAGCCAAGC	CATTTATCTC	AGTTGAATAC	GCTCACGCCA	TGGGCAACTC
6610	6620	6630	6640	6650	6660
CGTCGGTGAC	CTGGCCGCCT	ACACGGCCCT	GGAAAATAC	CCCCACTACC	AGGGCGGCTT
6670	6680	6690	6700	6710	6720
CATCTGGGAC	TGGATTGACC	AAGGACTGGA	AAAAGACGGG	CACCTGCTTT	ATGGGGGCGA
6730	6740	6750	6760	6770	6780
CTTCGATGAC	CGGCCAACCG	ACTATGAATT	CTGCGGGAAC	GGCCTGGTCT	TTGCTGACCG
6790	6800	6810	6820	6830	6840
GACTGAATCG	CCGAAACTGG	CTAATGTCAA	GGCCCTTTAC	GCCAACCTTA	AGTTAGAAGT
6850	6860	6870	6880	6890	6900
AAAAGATGGG	CAGCTCTTCC	TCAAAAACGA	CAATTTATTT	ACCAACAGCT	CATCTTACTA
6910	6920	6930	6940	6950	6960
CTTCTTGACT	AGTCTTTTGG	TCGATGGCAA	GTTGACCTAC	CAGAGCCGGC	CTCTGACCTT
6970	6980	6990	7000	7010	7020
TGGCCTGGAG	CCTGGCGAAT	CCGGGACCTT	TGCCCTGCCT	TGGCCGGAAG	TCGCTGATGA
7030	7040	7050	7060	7070	7080
AAAAGGGGAG	GTCGTCTACC	GGGTAACGGC	CCACTTAAAA	GAAGACTTGC	CTTGGGCGGA
7090	7100	7110	7120	7130	7140
TGAGGGCTTC	ACTGTGGCTG	AAGCAGAAGA	AGTAGCTCAA	AAGCTGCCGG	AATTTAAGCC
7150	7160	7170	7180	7190	7200
GGAAGGGCGG	CCAGATTTAG	TTGATTCCGA	CTACAACCTA	GGCCTGAAAG	GAAATAACTT

## 第5F圖

7210	7220	7230	7240	7250	7260
CCAAATTCTC	TTCTCCAAGG	TCAAGGGCTG	GCCGGTTTCC	CTCAAGTATG	CCGGTAGGGA
7270	7280	7290	7300	7310	7320
ATACTTGAAG	CGGCTGCCGG	AATTTACCTT	CTGGCGGGCC	CTGACGGACA	ACGACCGGGG
7330	7340	7350	7360	7370	7380
AGCTGGTTAC	GGCTATGATC	TGGCCCGGTG	GGAAAATGCC	GGCAAGTATG	CCCGCTTGAA
7390	7400	7410	7420	7430	7440
AGACATCAGC	TGCGAGGTCA	AGGAAGACTC	CGTTTTGGTC	AAGACTGCCT	TTACGTTGCC
7450	7460	7470	7480	7490	7500
TGTCGCCTTA	AAGGGTGATT	TAACCGTGAC	CTATGAAGTC	GATGGACGGG	GCAAGATTGC
7510	7520	7530	7540	7550	7560
TGTAACAGCT	GACTTCCCAG	GCGCGGAAGA	AGCTGGTCTC	TTGCCAGCCT	TTGGCTTGAA
7570	7580	7590	7600	7610	7620
CCTGGCCCTG	CCAAAAGAAC	TGACCGATTA	CCGCTACTAT	GGTCTGGGAC	CTAATGAGAG
7630	7640	7650	7660	7670	7680
CTACCCAGAC	CGCTTGGAAG	GTAATTACCT	GGGCATCTAC	CAGGGAGCGG	TAAAAAAGAA
7690	7700	7710	7720	7730	7740
CTTTAGCCCA	TATCGTCCGC	AGGAAACGGG	CAACCGGAGC	AAGGTTGCT	GGTACCAGCT
7750	7760	7770	7780	7790	7800
CTTTGATGAA	AAGGGCGGCT	TGGAATTTAC	GGCCAATGGG	GCAGACTTGA	ACTTGCTCTG
7810	7820	7830	7840	7850	7860
TTTGCCATAT	TCTGCCGCCC	AAATTGAAGC	AGCGGACCAC	GCTTTTGAAC	TGACTAACAA
7870	7880	7890	7900	7910	7920
TTACACTTGG	GTTAGAGCCT	TAAGCGCCCA	GATGGGGGTC	GGCGGGGATG	ACTCCTGGGG
7930	7940	7950	7960	7970	7980
GCAGAAGGTC	CACCCGGAAT	TCTGCCTGGA	TGCTCAAAAA	GCCCGCCAGC	TTCGCCTGGT
7990	8000	8010	8020	8030	8040
GATTTCAGCCC	CTTTTACTAA	AATAAATGCT	ACAATTGACT	TAACAGGATG	AAATTTTAGT
8050	8060	8070	8080	8090	8100
AAAAGCAAAG	CGAGTGAGGA	AGATGGCAAC	GATCAGAGAA	GTGCCAAGGC	AGCCGGCGTG
8110	8120	8130	8140	8150	8160
TCGCTAGCGA	CGGTC.....	.....	.....	.....	.....

第 5G 圖

10	20	30	40	50	60
GATGTACGGG	CCAGATATAC	GCGTTGACAT	TGATTATTGA	CTAGTTATTA	ATAGTAATCA
70	80	90	100	110	120
ATTACGGGGT	CATTAGTTCA	TAGCCCATAT	ATGGAGTTCC	GCGTTACATA	ACTTACGGTA
130	140	150	160	170	180
AATGGCCCGC	CTGGCTGACC	GCCCAACGAC	CCCCGCCCAT	TGACGTCAAT	AATGACGTAT
190	200	210	220	230	240
GTTCCCATAG	TAACGCCAAT	AGGGACTTTC	CATTGACGTC	AATGGGTGGA	CTATTTACGG
250	260	270	280	290	300
TAAACTGCCC	ACTTGGCAGT	ACATCAAGTG	TATCATATGC	CAAGTACGCC	CCCTATTGAC
310	320	330	340	350	360
GTCAATGACG	GTAAATGGCC	CGCCTGGCAT	TATGCCCAGT	ACATGACCTT	ATGGGACTTT
370	380	390	400	410	420
CCTACTTGGC	AGTACATCTA	CGTATTAGTC	ATCGCTATTA	CCATGGTGAT	GCGGTTTTGG
430	440	450	460	470	480
CAGTACATCA	ATGGGCGTGG	ATAGCGGTTT	GA CTCACGGG	GATTTC CAAG	TCTCCACCCC
490	500	510	520	530	540
ATTGACGTCA	ATGGGAGTTT	GTTTTGGCAC	CAAATCAAC	GGGACTTTCC	AAAATGTGCT
550	560	570	580	590	600
AACAAC TCCG	CCCCATTGAC	GCAAATGGGC	GGTAGGCGTG	TACGGTG GGA	GGTCTATATA
610	620	630	640	650	660
AGCAGAGCTC	TCTGGCTAAC	TAGAGAACCC	ACTGCTTACT	GGCTTATCGA	AATTAATACG
670	680	690	700	710	720
ACTCACTATA	GGGAGACCCA	AGCTTGGTAC	CGAGCTCGGA	TCCACTAGTA	ACGGCCGCCA
730	740	750	760	770	780
GTGTGCTGGA	ATTCTGCAGA	TATCCATCAC	ACTGGCGGCC	GCTCGAGCAT	GCATCTAGAG
790	800	810	820	830	840
GGCCCTATTC	TATAGTGTCA	CCTAAATGCT	AGAGCTCGCT	GATCAGCCTC	GACTGTGCCT
850	860	870	880	890	900
TCTAGTTGCC	AGCCATCTGT	TGTTTGCCCC	TCCCCCGTGC	CTTCCTTGAC	CCTGGAAGGT
910	920	930	940	950	960
GCCACTCCCA	CTGTCCCTTC	CTAATAAAAAT	GAGGAAATTG	CATCGCATTG	TCTGAGTAGG
970	980	990	1000	1010	1020
TGTCATTCTA	TTCTGGGGGG	TGGGGTGGGG	CAGGACAGCA	AGGGGGAGGA	TTGGGAAGAC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AATAGCAGGC	ATGCTGGGGA	TGCGGTGGGC	TCTATGGCTT	CTGAGGCGGA	AAGAACCAGC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TGCATTAATG	AATCGGCCAA	CGCGCGGGGA	GAGGCGGTTT	GCGTATTGGG	CGCTCTTCCG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CTTCCTCGCT	CACTGACTCG	CTGCGCTCGG	TCGTTGCGCT	GCGGCGAGCG	GTATCAGCTC

第6A圖

第6B圖

第6C圖

第6D圖

第6E圖

第6F圖

第6G圖

## 第6A圖

1210	1220	1230	1240	1250	1260
ACTCAAAGGC	GGTAATACGG	TTATCCACAG	AATCAGGGGA	TAACGCAGGA	AAGAACATGT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GAGCAAAAGG	CCAGCAAAAG	GCCAGGAACC	GTAAAAAGGC	CGCGTTGCTG	GCGTTTTTCC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ATAGGCTCCG	CCCCCTGAC	GAGCATCACA	AAAATCGACG	CTCAAGTCAG	AGGTGGCGAA
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ACCCGACAGG	ACTATAAAGA	TACCAGGCGT	TTCCCCCTGG	AAGCTCCCTC	GTGCGCTCTC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CTGTTCCGAC	CCTGCCGCTT	ACCGGATACC	TGTCCGCCTT	TCTCCCTTCG	GGAAGCGTGG
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CGCTTTCTCA	ATGCTCACGC	TGTAGGTATC	TCAGTTCCGT	GTAGGTCGTT	CGCTCCAAGC
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TGGGCTGTGT	GCACGAACCC	CCCGTTCAGC	CCGACCGCTG	CGCCTTATCC	GGTAACTATC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
GTCTTGAGTC	CAACCCGGTA	AGACACGACT	TATCGCCACT	GGCAGCAGCC	ACTGGTAACA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GGATTAGCAG	AGCGAGGTAT	GTAGGCGGTG	CTACAGAGTT	CTTGAAGTGG	TGGCCTAACT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACGGCTACAC	TAGAAGGACA	GTATTTGGTA	TCTGCGCTCT	GCTGAAGCCA	GTTACCTTCG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GAAAAAGAGT	TGGTAGCTCT	TGATCCGGCA	AACAAACCAC	CGCTGGTAGC	GGTGGTTTTT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TTGTTTGCAA	GCAGCAGATT	ACGCGCAGAA	AAAAAGGATC	TCAAGAAGAT	CCTTTGATCT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
TTTCTACGGG	GTCTGACGCT	CAGTGAACG	AAACTCACG	TTAAGGGATT	TTGGTCATGA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAT	AGGGGTTCGG	CGCACATTTT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CCCGAAAAGT	GCCACCTGAC	GTCGACGGAT	CGGGAGATCA	TATCCTGACA	TTCTCTTTAC
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CAAATAAAAT	AATTTTGTTC	ATTAAAATCC	CATTTTGCGA	CAACTTCTTC	CGCAGCTTCC
2170	2180	2190	2200	2210	2220
ATTTGCTCTT	TGGTGTAATC	TTCATCGCCA	ACATGAACCTA	AATCACCATT	CTCAACATCT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TCAAGTTTCA	AATCTTGCTT	AATTTGCTTT	AATAATCCAC	CATAGCTGAT	TTGTCGTGTT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
CCAGCTAAGG	CATACTCCAA	ATTTTTAATC	ACCACCAAAT	TACGCTCATC	ATCAGCCGTC
2350	2360	2370	2380	2390	2400
ATATAATCAG	CTGATTTTAC	CTCGTATTTT	GCCGTTTCTT	CGGCACTAGC	TTGCAAAGAG

第 6B 圖

2410	2420	2430	2440	2450	2460
TCAGTTCCTT	TACGTTTGTT	AGCTTTAACA	GCCTGCACAT	GCACCACAGG	CTCATAATCA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
ACTTTCAAGG	CTTTTIGCCA	TAATTTTGCC	CATTCTGCTT	GTGCTAAATA	ATTATTTGAA
2530	2540	2550	2560	2570	2580
TTCTTAAAT	AACCTGATTT	TACAAACAGC	AACACATGCA	AGTGTTGATT	ATATGACCCG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
TCTTGTTTAT	TAACGGTAAT	TTCCGTTGAA	CGTAAATAAC	CCAATAAATT	TTTAGTCACT
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TTTTTATAGC	GAGTTAGCTT	ATTAAAGGCT	TTAGTCAAAG	CTCTTAAAGA	CACTTTTAAC
2710	2720	2730	2740	2750	2760
TCCTCTGCTG	AATGAGCGTT	TTTAACGGTT	AAAGTTAAAA	ACAAAAACCG	TCCTTTAGGC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
TCTCTTGCAA	CTGCTTCCGC	AATAATTTGT	TTTAACCTGGC	TCGAGTTTTT	CATGCTCCTT
2830	2840	2850	2860	2870	2880
CTCCAATTAC	ACAATGGACA	CAATCGTTTA	TGACAAAACC	ACGTTTGATA	AAGTTTAAAG
2890	2900	2910	2920	2930	2940
TGCTCGCCAA	TCTTACGAAA	ACGCAAACT	TCACCACAAC	CCCGTACATC	ATGTGCCCCT
2950	2960	2970	2980	2990	3000
TTAAATTCTA	AGATTGCCAA	ATATTGCGCA	TAGCGCACAT	TTTCAATCTT	CCGTTCTCGC
3010	3020	3030	3040	3050	3060
CAAGGTCTAA	CTTTGCCATT	TTCAGTTTTA	TCTTCAAAAA	TTTCTGACAT	AAAAAGCTCC
3070	3080	3090	3100	3110	3120
TCCAGTTTAT	CCACGTGAAG	GAGCTGACTA	TCTTTTTCAA	TAAGCTTATA	ACCTTGACAT
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CATAGGGCTT	TTCCCCTAGA	ATAGGCTATA	AATCGCAAAT	GATAATCAAC	TCACGTGTTT
3190	3200	3210	3220	3230	3240
CGAGCGGCCA	AACTAGGAAT	TTGCACGTGG	GTTTTTATTT	TGTCTTTCTT	TCAACCAATT
3250	3260	3270	3280	3290	3300
TATAACCCTA	ATAATACACC	AAAAGCCTAT	AAAATCAATG	GATACAAGCC	CAATTAAGCC
3310	3320	3330	3340	3350	3360
TAATCAAGCT	TGATTTTAAA	AAACTAGTTG	TTGCTAATAG	TATCAAGATA	AGAAGAAAAC
3370	3380	3390	3400	3410	3420
GCCAAAAATT	GCGTTTTTAA	ACCCCAAAAA	GCAGATCAGC	AAAAACCGCT	GAACTGCTTT
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TTTTAAACCG	TGGCTTTCAG	CCACACTGAC	CAGCTGAACC	AGCTGGACCG	TAACGCTTGC
3490	3500	3510	3520	3530	3540
CGCCGCTGGG	CTCGGGAAAA	CAAGGGCTTG	TTTTCCAAGA	CGTCAGGCTT	TTGGTATTTG
3550	3560	3570	3580	3590	3600
CTAGTCTATC	AACTCCTTAA	AGCCTCCAAG	AGGGGCTAAT	ATCGCCTGTA	AGGCTCAATA

## 第6C圖

3610	3620	3630	3640	3650	3660
AGCCCCCTCTA	AGTCGATTTA	CCGTTGACAG	ACAGTTAGAT	AGCTAACTGT	TAGCTAAAAT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
CGCTTAGAAC	GCAAATAAGA	GCCTTTAAAA	TTAACGTTCA	AAAATAAAAA	AGTTCGAAGG
3730	3740	3750	3760	3770	3780
AGCTAGCGAC	TGAACTTATT	TATTTTGTAA	TGTTCCAAAC	TGACGCAAGT	CAGTTACGTT
3790	3800	3810	3820	3830	3840
TGAGCAACGC	GAAATCTGAT	GCAGGTTTTG	ATGGGTTTAG	CACAACACAA	CTTCATGTTG
3850	3860	3870	3880	3890	3900
TGTGTAAGTG	CGCACTACAT	GATAATGCGC	ACTACATGAT	AATGCGCACT	ACATGATAAT
3910	3920	3930	3940	3950	3960
GTGCGCACTA	CATGATAATG	CGCACTACAT	GATAATGTAC	ATGATAATGT	GCGCACTACA
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TGATAATGCG	CACTACATGA	TAATGCGCAC	TACATGATAA	TGCGCACTAC	ATGATAATGC
4030	4040	4050	4060	4070	4080
GCACTACATG	ATAATGCGCA	CTACATGATA	ATGCGCACTA	CATGATAATG	TGCACTTACA
4090	4100	4110	4120	4130	4140
CTCCAAATAA	ATTGGAGTAA	TGCTAAAACC	TGTATCAGAA	GTCAGCAAGC	TGACAACAAA
4150	4160	4170	4180	4190	4200
AAAGGGATAT	GCCAACGGAT	TTACCGTTGA	TCTCCCGATC	CCCTATGGTC	GACTCTCAGT
4210	4220	4230	4240	4250	4260
ACAATCTGCT	CTGATGCCGC	ATAGTTAAGC	CAGTATCTGC	TCCCTGCTTG	TGTGTTGGAG
4270	4280	4290	4300	4310	4320
GTCGCTGAGT	AGTGCGCGAG	CAAAATTTAA	GCTACAACAA	GGCAAGGCTT	GACCGACAAT
4330	4340	4350	4360	4370	4380
TGCATGAAGA	ATCTGCTTAG	GGTTAGGCGT	TTTGCGCTGC	TTCGTTAGAA	GCAAATAAG
4390	4400	4410	4420	4430	4440
AGTGTGTTGA	GTAGTGCACT	ATCTTAAAAT	TTTGTATAAT	AGGAATTGAA	GTAAATTAG
4450	4460	4470	4480	4490	4500
ATGCTAAAAA	TTTGTAATTA	AGAAGGAGTG	ATTACATGAT	TGGCAGCCAG	TCTCCGGGCA
4510	4520	4530	4540	4550	4560
ATTAATGAAC	TTGGACATGG	TTGACGACCC	GGTCTTTGCA	AGCCGAATTC	GACCACACTG
4570	4580	4590	4600	4610	4620
GCGGCCGTTA	CTAGGGTATC	GATCCGATAA	AAAGTTAGGC	GACGGCTTTG	CCCTGGTGCC
4630	4640	4650	4660	4670	4680
AGCAGACGGT	AAGGTCTACG	CGCCATTTGC	CGGTACTGTC	CGCCAGCTGG	CCAAGACCCG
4690	4700	4710	4720	4730	4740
GCACTCGATC	GTCCTGGAAA	ATGAACATGG	GGTCTTTGGC	TTGATTCAAC	TTGGCCTGGG
4750	4760	4770	4780	4790	4800
CACGGTCAAA	TTAAACGGGA	CTGGCTTTGT	CAGCTATGTT	GAAGAGGGCA	GCCAGGTAGA

## 第 6D 圖

4810	4820	4830	4840	4850	4860
AGCCGGCCAG	CAGATCCTGG	AATTCTGGGA	CCCGCGGATC	AAGCAGGCCA	AGCTGGACGA
4870	4880	4890	4900	4910	4920
CACGGTAATC	GTGACCGTCA	TCAACAGCGA	AACTTTCACA	AATAGCCAGA	TGCTCTTGCC
4930	4940	4950	4960	4970	4980
GATCGGCCAC	AGCGTCCAAG	CCCTGGATGA	TGTATTCAAG	TTAGAAGGGA	AGAATTAGAA
4990	5000	5010	5020	5030	5040
AATGAGCAAT	AAGTTAGTAA	AAGAAAAAAG	AGTTGACCAG	GCAGACCTGG	CCTGGCTGAC
5050	5060	5070	5080	5090	5100
TGACCCGGAA	GTTTACGAAG	TCAATACAAT	TCCCCCGCAC	TCCGACCATG	AGTCCTTCCA
5110	5120	5130	5140	5150	5160
AAGCCAGGAA	GAAGTGGAGG	AGGGCAAGTC	CAGTTTAGTG	CAGTCCCTGG	ACGGGGACTG
5170	5180	5190	5200	5210	5220
GCTGATTGAC	TACGCTGAAA	ACGGCCAGGG	ACCAGTCAAC	TTCTATGCAG	AAGACTTTGA
5230	5240	5250	5260	5270	5280
CGATAGCAAT	TTTAAGTCAG	TCAAAGTACC	CGGCAACCTG	GAAGTGAAG	GCTTTGGCCA
5290	5300	5310	5320	5330	5340
GCCCCAGTAT	GTCAACGTCC	AATATCCATG	GGACGGCAGT	GAGGAGATTT	TCCCCCCCCA
5350	5360	5370	5380	5390	5400
AATTCCAAGC	AAAAATCCGC	TCGCTTCTTA	TGTCAGATAC	TTTGACCTGG	ATGAAGCTTT
5410	5420	5430	5440	5450	5460
CTGGGACAAG	GAAGTCAGCT	TGAAGTTTGA	CGGGGCGGCA	ACAGCCATCT	ATGTCTGGCT
5470	5480	5490	5500	5510	5520
GAACGGCCAC	TTCGTCGGCT	ACGGGGAAGA	CTCCTTTACC	CCAAGCGAGT	TTATGGTTAC
5530	5540	5550	5560	5570	5580
CAAGTTCCCT	AAGAAAGAAA	ATAACCGCCT	GGCAGTGGCT	CTCTACAAGT	ATTCTTCCGC
5590	5600	5610	5620	5630	5640
CTCCTGGCTG	GAAGACCAGG	ACTTCTGGCG	CATGTCTGGT	TTGTTTCAGAT	CAGTGACTCT
5650	5660	5670	5680	5690	5700
TCAGGCCAAG	CCGCGTCTGC	ACTTGGAGGA	CCTTAAGCTT	ACGGCCAGCT	TGACCGATAA
5710	5720	5730	5740	5750	5760
CTACCAAAAA	GGAAAGCTGG	AAGTCGAAGC	CAATATTGCC	TACCGCTTGC	CAAATGCCAG
5770	5780	5790	5800	5810	5820
CTTTAAGCTG	GAAGTGCGGG	ATAGTGAAGG	TGACTTGGTT	GCTGAAAAGC	TGGGCCCAAT
5830	5840	5850	5860	5870	5880
CAGAAGCGAG	CAGCTGGAAT	TCACTCTGGC	TGATTTGCCA	GTAGCTGCCT	GGAGCGCGGA
5890	5900	5910	5920	5930	5940
AAAGCCTAAC	CTTTACCAGG	TCCGCCTGTA	TTTATACCAG	GCAGGCAGCC	TCTTAGAGGT
5950	5960	5970	5980	5990	6000
TAGCCGGCAG	GAAGTGGGTT	TCCGCAACTT	TGAACTAAAA	GACGGGATTA	TGTACCTTAA

## 第6E圖

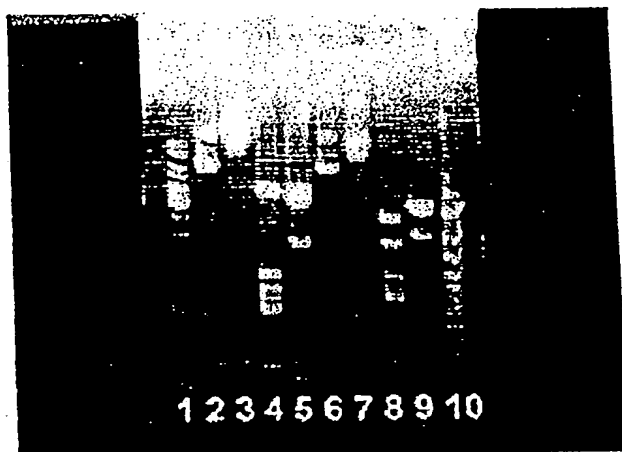


6010	6020	6030	6040	6050	6060
CGGCCAGCGG	ATCGTCTTCA	AGGGGGCCAA	CCGGCACGAA	TTTGACAGTA	AGTTGGGTCTG
6070	6080	6090	6100	6110	6120
GGCTATCACG	GAAGAGGATA	TGATCTGGGA	CATCAAGACC	ATGAAGCGAA	GCAACATCAA
6130	6140	6150	6160	6170	6180
TGCTGTCCGC	TGCTCTCACT	ACCCGAACCA	GTCCCTCTTT	TACCGGCTCT	GTGACAAGTA
6190	6200	6210	6220	6230	6240
CGGCCTTTAC	GTCATTGATG	AAGCTAACCT	GGAAAGCCAC	GGCACCTGGG	AAAAAGTGGG
6250	6260	6270	6280	6290	6300
GGGGCACGAA	GATCCTAGCT	TCAATGTTCC	AGGCGATGAC	CAGCATTGGC	TGGGAGCCAG
6310	6320	6330	6340	6350	6360
CTTATCCCGG	GTGAAGAACA	TGATGGCTCG	GGACAAGAAC	CATGCTTCAA	TCCTAATCTG
6370	6380	6390	6400	6410	6420
GTCTTTAGGC	AATGAGTCTT	ACGCCGGCAC	TGTCTTTGCC	CAAATGGCTG	ATTACGTCCG
6430	6440	6450	6460	6470	6480
GAAGGCTGAT	CCGACCCGGG	TTCAGCACTA	TGAAGGGGTG	ACCCACAACC	GGAAGTTTGA
6490	6500	6510	6520	6530	6540
CGACGCCACC	CAGATTGAAA	GCCGGATGTA	TGCTCCGGCC	AAGGTAATTG	AAGAATACTT
6550	6560	6570	6580	6590	6600
GACCAATAAA	CCAGCCAAGC	CATTTATCTC	AGTTGAATAC	GCTCACGCCA	TGGGCAACTC
6610	6620	6630	6640	6650	6660
CGTCGGTGAC	CTGGCCGCCT	ACACGGCCCT	GGAAAATAC	CCCCACTACC	AGGGCGGCTT
6670	6680	6690	6700	6710	6720
CATCTGGGAC	TGGATTGACC	AAGGACTGGA	AAAAGACGGG	CACCTGCTTT	ATGGGGGCGA
6730	6740	6750	6760	6770	6780
CTTCGATGAC	CGGCCAACCG	ACTATGAATT	CTGCGGGAAC	GGCCTGGTCT	TTGCTGACCG
6790	6800	6810	6820	6830	6840
GACTGAATCG	CCGAAACTGG	CTAATGTCAA	GGCCCTTTAC	GCCAACCTTA	AGTTAGAAGT
6850	6860	6870	6880	6890	6900
AAAAGATGGG	CAGCTCTTCC	TCAAAAACGA	CAATTTATTT	ACCAACAGCT	CATCTTACTA
6910	6920	6930	6940	6950	6960
CTTCTTGACT	AGTCTTTTGG	TGCATGGCAA	GTTGACCTAC	CAGAGCCGGC	CTCTGACCTT
6970	6980	6990	7000	7010	7020
TGGCCTGGAG	CCTGGCGAAT	CCGGGACCTT	TGCCCTGCCT	TGGCCGGAAG	TCGCTGATGA
7030	7040	7050	7060	7070	7080
AAAAGGGGAG	GTCGTCTACC	GGGTAACGGC	CCACTTAAAA	GAAGACTTGC	CTTGGGCGGA
7090	7100	7110	7120	7130	7140
TGAGGGCTTC	ACTGTGGCTG	AAGCAGAAGA	AGTAGCTCAA	AAGCTGCCGG	AATTTAAGCC
7150	7160	7170	7180	7190	7200
GGAAGGGCGG	CCAGATTTAG	TTGATTCCGA	CTACAACCTA	GGCCTGAAAG	GAAATAACTT

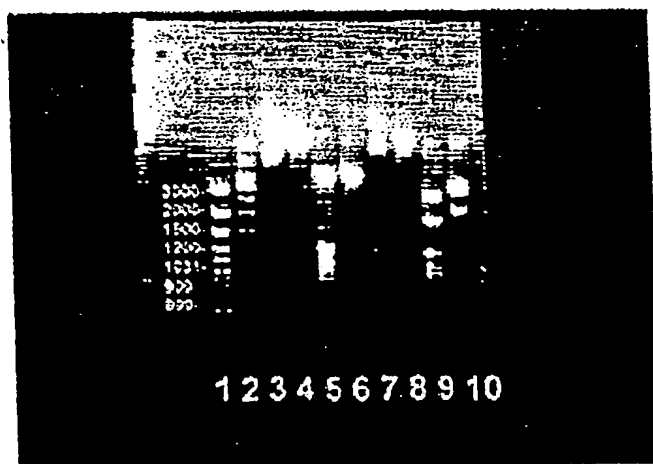
## 第6F圖

7210	7220	7230	7240	7250	7260
CCAAATTCTC	TTCTCCAAGG	TCAAGGGCTG	GCCGGTTTCC	CTCAAGTATG	CCGGTAGGGA
7270	7280	7290	7300	7310	7320
ATACTTGAAG	CGGCTGCCGG	AATTTACCTT	CTGGCGGGCC	CTGACGGACA	ACGACCGGGG
7330	7340	7350	7360	7370	7380
AGCTGGTTAC	GGCTATGATC	TGGCCCGGTG	GGAAAATGCC	GGCAAGTATG	CCCCTTGAA
7390	7400	7410	7420	7430	7440
AGACATCAGC	TGCGAGGTCA	AGGAAGACTC	CGTTTTGGTC	AAGACTGCCT	TTACGTTGCC
7450	7460	7470	7480	7490	7500
TGTCGCCCTTA	AAGGGTGATT	TAACCGTGAC	CTATGAAGTC	GATGGACGGG	GCAAGATTGC
7510	7520	7530	7540	7550	7560
TGTAACAGCT	GACTTCCCAG	GCGCGGAAGA	AGCTGGTCTC	TTGCCAGCCT	TTGGCTTGAA
7570	7580	7590	7600	7610	7620
CCTGGCCCTG	CCAAAAGAAC	TGACCGATTA	CCGCTACTAT	GGTCTGGGAC	CTAATGAGAG
7630	7640	7650	7660	7670	7680
CTACCCAGAC	CGCTTGGAAG	GTAATTACCT	GGGCATCTAC	CAGGGAGCGG	TAAAAAAGAA
7690	7700	7710	7720	7730	7740
CTTTAGCCCA	TATCGTCCGC	AGGAAACGGG	CAACCGGAGC	AAGGTTGCT	GGTACCAGCT
7750	7760	7770	7780	7790	7800
CTTTGATGAA	AAGGGCGGCT	TGGAATTTAC	GGCCAATGGG	GCAGACTTGA	ACTTGTCTGC
7810	7820	7830	7840	7850	7860
TTTGCCATAT	TCTGCCGCCC	AAATTGAAGC	AGCGGACCAC	GCTTTTGAAC	TGACTAACAA
7870	7880	7890	7900	7910	7920
TTACACTTGG	GTTAGAGCCT	TAAGCGCCCA	GATGGGGGTC	GGCGGGGATG	ACTCCTGGGG
7930	7940	7950	7960	7970	7980
GCAGAAGGTC	CACCCGGAAT	TCTGCCTGGA	TGCTCAAAAA	GCCCGCCAGC	TTCGCCTGGT
7990	8000	8010	8020	8030	8040
GATTCAGCCC	CTTTTACTAA	AATAAATGCT	ACAATTGACT	TAACAGGATG	AAATTTTAGT
8050	8060	8070	8080	8090	8100
AAAAGCAAAG	CGAGTGAGGA	AGATGGCAAC	GATCAGAGAA	GTGCCAAGGC	AGCCGGCGTG
8110	8120	8130	8140	8150	8160
TCGCTAGCGA	CGGTC.....	.....	.....	.....	.....

第 6G 圖

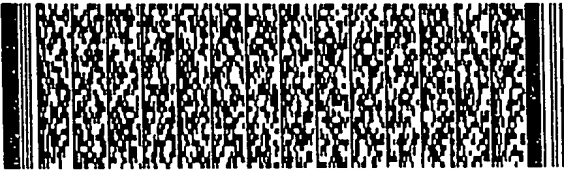


第7A圖



第7B圖

第 1/22 頁



第 2/22 頁



第 3/22 頁



第 4/22 頁



第 4/22 頁



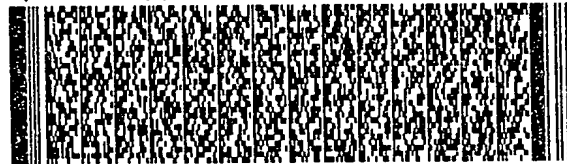
第 5/22 頁



第 5/22 頁



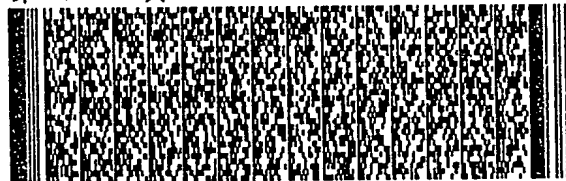
第 6/22 頁



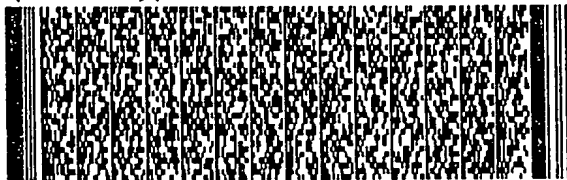
第 6/22 頁



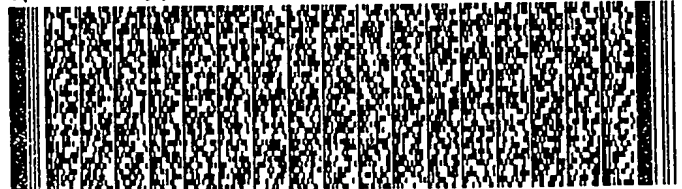
第 7/22 頁



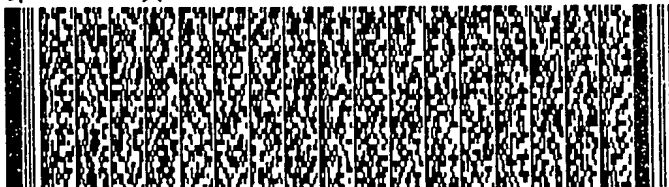
第 7/22 頁



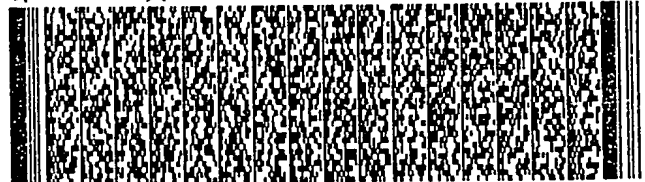
第 8/22 頁



第 8/22 頁



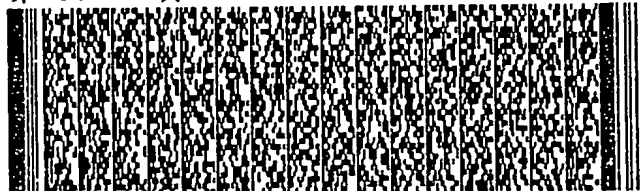
第 9/22 頁



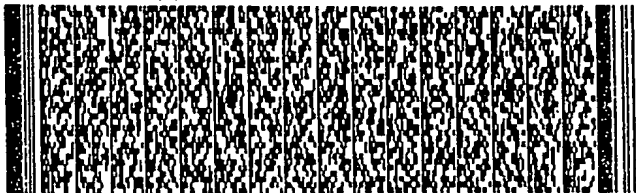
第 9/22 頁



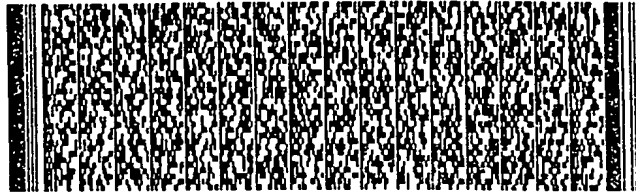
第 10/22 頁



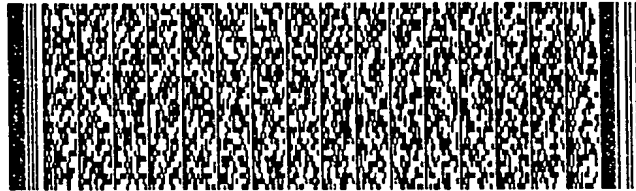
第 10/22 頁



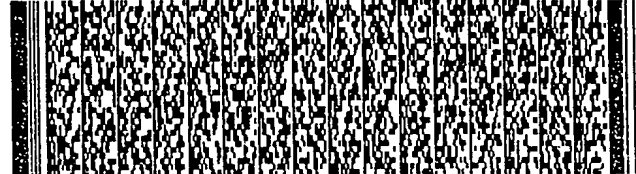
第 11/22 頁



第 11/22 頁



第 12/22 頁



第 12/22 頁



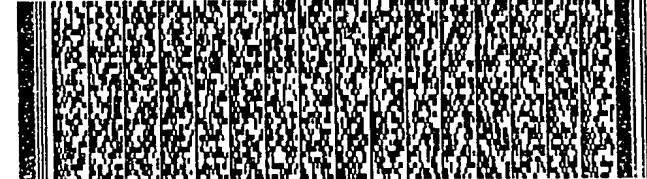
第 13/22 頁



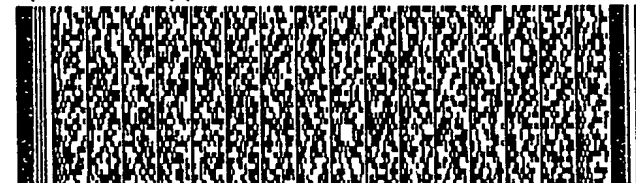
第 13/22 頁



第 14/22 頁



第 14/22 頁



第 15/22 頁



第 15/22 頁



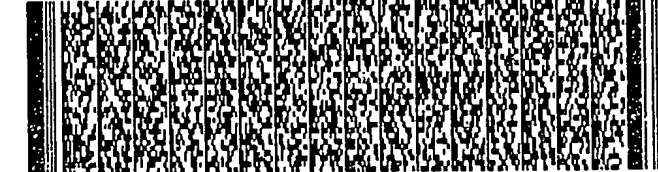
第 16/22 頁



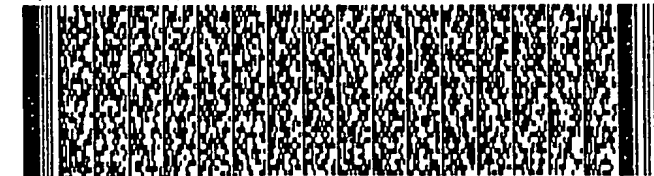
第 16/22 頁



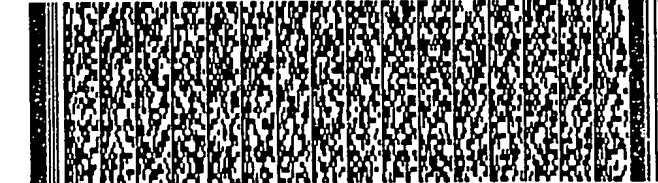
第 17/22 頁



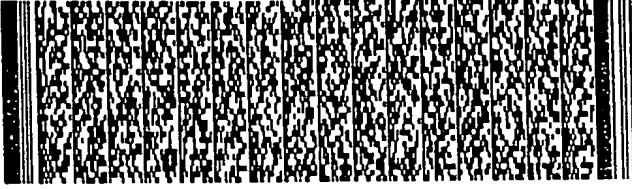
第 17/22 頁



第 18/22 頁



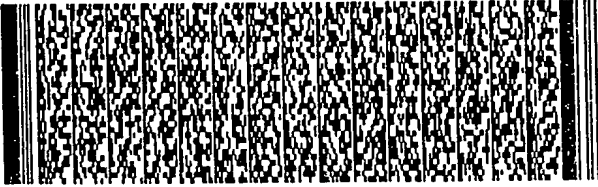
第 18/22 頁



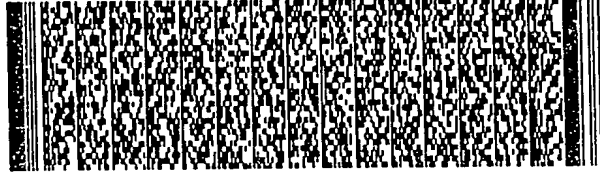
第 19/22 頁



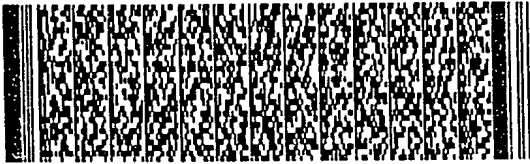
第 19/22 頁



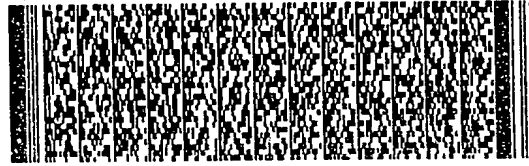
第 20/22 頁



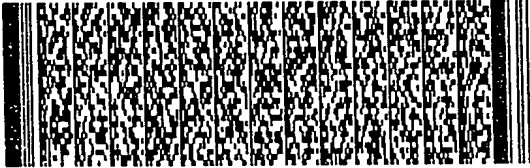
第 21/22 頁



第 21/22 頁



第 22/22 頁



第 22/22 頁

